



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2014/2015**

Departamento de Ambiente e  
Ordenamento

**Tomás Iria Cristino**

**Seleção de culturas produtoras de polímeros  
biodegradáveis em reatores SBR**



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2014/2015**

Departamento de Ambiente e  
Ordenamento

**Tomás Iria Cristino**

**Seleção de culturas produtoras de polímeros  
biodegradáveis em reatores SBR**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Mestrado Integrado em Engenharia de Ambiente, realizada sob a orientação científica da Professora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela, Professora Associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e à minha avó pelo apoio incansável.

**o júri**  
presidente

**Prof. Doutor António José Barbosa Samagaio**  
professor associado do Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor Armando Da Costa Duarte**  
professor catedrático do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Isabel Aparício Paulo Fernandes Capela**  
professora associada do Departamento de Ambiente e Ordenamento, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Deixo os meus agradecimentos aos meus pais que sempre me apoiaram ao longo do meu percurso académico, embora que à distância, dispuseram-se sempre a ajudar e estiveram a meu lado nos bons e nos maus momentos.

À minha avó que também sempre demonstrou o seu apoio e, como os meus pais, sempre acreditou no meu sucesso.

Relativamente ao grupo de trabalho, sem o qual a realização desta tese não seria possível, resta-me agradecer à Cátia Couras e Rita Marinho pela disponibilidade em ajudar, à Fátima Sousa que me acompanhou desde o início com a montagem dos reatores e explicações de funcionamento, bem como dicas para a realização do trabalho e por ultimo à Tânia Gameiro pelo trabalho incansável na ajuda à resolução de problemas, na transmissão de conhecimento, deveras necessário para a obtenção do produto final e principalmente paciência por vezes necessária para que o trabalho fosse para avante.

## palavras-chave

Resíduos; Efluentes; Soro de leite; FORSU; Digestão aeróbia; culturas mistas; SBR; batch; CQO; AOV; polihidroxialcanoatos; PHA.

## resumo

Com a realização deste trabalho pretende-se obter biopolímero a partir de resíduos/subprodutos orgânicos usando culturas mistas provenientes de sistemas de tratamento de lamas ativadas existentes em ETARs e selecionadas em reatores SBR. Recorreu-se a uma alimentação rica em ácidos orgânicos voláteis como fonte de carbono para as culturas mistas em regime de fome/fartura, para que estas acumulem polihidroxialcanoatos (PHA) e ao mesmo tempo testar o nível de tratamento através de análises de CQO. Neste estudo foram assim utilizados dois tipos de substratos: FORSU e soro de leite acidificados e obtidos previamente por fermentação anaeróbia. Numa primeira fase de seleção das culturas produtoras de PHA obtiveram-se níveis de remoção de CQO que chegaram a ultrapassar os 95% o que denota grandes eficiências de tratamento. O estudo dos ciclos dos reatores SBR em termos de evolução de oxigénio dissolvido levou a uma melhor compreensão do regime fome/ fartura, que é uma estratégia preponderante na fase de seleção das culturas mistas acumuladoras de PHA. Numa segunda fase, foram efetuados ensaios *batch* de acumulação de PHA, onde foram testadas três condições distintas (pH, carga orgânica e rácio C:N:P), tendo-se atingido o valor máximo de acumulação de PHA de 41,97% (w/w) de PHA /biomassa, para o ensaio com uma carga orgânica de 2 g<sub>CQO</sub>/L.d e com limitação do azoto adicionado. Comparando as duas alimentações em estudo, o soro de leite acidificado apresentou os melhores resultados nas diversas condições, comparativamente à FORSU acidificada. Em termos de conversão de CQO em PHA, os ensaios que se revelaram mais eficientes na acumulação de PHA, para cada tipo de substrato adicionado, foram os que tinham limitação do azoto adicionado e/ou pH mais elevado na alimentação.

**keywords**

waste; effluents; OFMSW; milk whey; aerobic digestion; mixed cultures; SBR; batch; COD; VFA; polyhydroxyalkanoates; PHA

**abstract**

With this work it was intend to obtain biopolymers from waste/by-products using mixed cultures from activated sludge treatment systems existing in WWTP and selected in SBR reactors. It was used a substrate rich in volatile organic acids as a carbon source for the mixed cultures through a famine/abundance strategy, in order to produce polyhydroxyalkanoates (PHA) and at the same time test the degree of treatment, using COD analysis. In this study it was used two types of substrates: acidified OFMSW and acidified milk whey previously obtained by anaerobic fermentation. At a first stage of PHA-producing microorganisms selection, it was obtained COD removals that reached levels exceeding 95%, which indicates great treatment efficiencies. The study of the performance cycle of the SBR reactors in terms of dissolved oxygen evolution has led to a better understanding of famine/abundance regime, which is a major strategy in the selection phase of PHA accumulating mixed cultures. In a second stage, batch assays were performed for PHA accumulation, and were tested three different conditions (pH, organic load and C:N:P ratio), having reached a maximum value of PHA accumulation of 41.97% (w/w) of PHA/biomass, for the assay with an organic load of 2 gCQO / Ld and a limitation of the added nitrogen. Comparing the two different substrates used in the study, the acidified whey showed the best results for the different conditions compared to the results obtained for the acidified OFMSW. In terms of COD conversion to PHA, the assays which proved to be most efficient for PHA accumulating, for each type of substrate added, were the ones which had a limitation in the added nitrogen and/or a higher feeding pH.





# Índice

Índice .....	IX
Índice de Figuras .....	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Abreviaturas .....	XIV
1. Introdução.....	1
1.1. Tratamentos de resíduos e efluentes .....	1
1.2. Origem e importância dos plásticos.....	1
1.3. Relação entre o tratamento de resíduos e a produção de plásticos .....	2
1.4. Objetivos .....	2
2. Revisão bibliográfica .....	3
2.1. Atualidade da gestão de resíduos .....	3
2.1.1. Composição dos RU em Portugal .....	4
2.1.2. Tipos de valorização energética/ material .....	4
2.2. Tratamento aeróbio .....	7
2.2.1. Reatores aeróbios do tipo SBR.....	7
2.2.1. Culturas puras vs. Culturas mistas .....	9
2.2.3. Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV).....	10
2.3. Biopolímeros .....	12
2.3.1. O que são os polihidroxialcanoatos (PHA)? .....	13
2.3.2. Formas de produção de PHA.....	15
2.3.3. Aplicações do biopolímero.....	15
3. Materiais e Métodos .....	17
3.1. Instalação laboratorial.....	17
3.2. Reator sequencial (SBR) .....	17
3.2.1. Alimentação dos SBR.....	18
3.3. Ensaio em reatores descontínuos para acumulação de biopolímero .....	21
3.3.1. Alimentação dos reatores descontínuos.....	22
3.4. Monitorização dos sistemas biológicos.....	24
3.5. Métodos analíticos .....	25
3.5.1. Carência Química de Oxigénio (CQO).....	25
3.5.2. Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV).....	25
3.5.3. Monitorização dos níveis de oxigénio e pH.....	26

3.5.4.	AOV.....	26
3.5.5.	PHA.....	27
4.	Resultados e discussão.....	30
4.1.	Fase de seleção das culturas .....	30
4.1.1.	Fase fome/fartura .....	30
4.1.2.	Desempenho dos reatores na fase de seleção.....	33
4.2.	Fase de acumulação em reatores descontínuos .....	46
4.2.1.	Alimentação de acidificado de FORSU .....	47
4.2.2.	Alimentação de acidificado de soro de leite .....	52
4.2.3.	Discussão de resultados dos ensaios de reatores descontínuos .....	57
5.	Conclusão .....	60
6.	Projetos futuros.....	61
7.	Bibliografia .....	62

## Índice de Figuras

Figura 1 - Composição física média dos RU produzidos em Portugal Continental, no ano 2012 (PERSU 2020, 2014).....	4
Figura 2 - Fases do processo de Digestão Anaeróbia (adaptado de Appels et al., 2008) .....	6
Figura 3 - Ciclo de operação do SBR.....	8
Figura 4 - Processo de produção de AOV e potenciais aplicações (adaptado de Lee et al. (2014))	11
Figura 5 - Esquema de operação do SBR (Digestão anaeróbia não realizada neste trabalho) .....	17
Figura 6 - Curvas de calibração para os AOV em estudo .....	27
Figura 7 - Reta de calibração HB .....	29
Figura 8 - Reta de calibração HV .....	29
Figura 9 - Perfil de oxigénio dissolvido no regime Fome/Fartura .....	31
Figura 10 - Ciclo SBR 4 .....	32
Figura 11 - Carência Química de Oxigénio SBR 1 .....	34
Figura 12 - Carência Química de Oxigénio SBR 3 .....	34
Figura 13 - Carga orgânica SBR 1 e SBR 3.....	35
Figura 14 - Teor de biomassa SBR 1 .....	36
Figura 15 - Teor de biomassa SBR 3 .....	36
Figura 16 - Carência Química de Oxigénio SBR 2 .....	37
Figura 17 - Carência Química de Oxigénio SBR 4 .....	38
Figura 18 - Carga orgânica SBR 2 e SBR 4.....	38
Figura 19 - Teor de biomassa SBR 2 .....	39
Figura 20 - Teor de biomassa SBR 4 .....	39
Figura 21 - Comparação de remoção de CQO no SBR 1 e no SBR 2.....	40
Figura 22 - Carga orgânica SBR 2 e SBR 4.....	41
Figura 23 - Teor de sólidos no SBR 1 e no SBR 2 .....	42
Figura 24 - Comparação de remoção de CQO no SBR 3 e no SBR 4.....	43
Figura 25 - Carga orgânica SBR 3 e SBR 4.....	43
Figura 26 - Teor de sólidos no SBR 3 e no SBR 4 .....	44
Figura 27 - PHA nos SBR .....	46
Figura 28 – Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B1 (pH na alimentação de 5).	48
Figura 29 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B2 (pH na alimentação de 10)	48
Figura 30 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B5 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d).....	49
Figura 31 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B6 (carga orgânica de 3 gCQO/L.d).....	50
Figura 32 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B9 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d).....	51
Figura 33 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B5 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d).....	52
Figura 34 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B3 (pH na alimentação de 5) .	53
Figura 35 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B4 (pH na alimentação de 10)	53
Figura 36 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B7 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d).....	54

Figura 37 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B8 (carga orgânica de 3 gCQO/L.d) .....	55
Figura 38 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B10 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d) .....	56
Figura 39 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B7 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d) .....	57

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Bactérias utilizadas para produção de PHA com diferentes substratos (adaptado de Reddy et al., 2003) .....	14
Tabela 2 - Condições de operação dos reatores SBR .....	18
Tabela 3 - Volumes nutrientes para as diferentes condições nos SBR (mL/ L de alimentação) .....	19
Tabela 4 - Constituintes do Meio Mineral.....	19
Tabela 5 - Constituintes da solução de Micronutrientes .....	19
Tabela 6 - Caracterização do acidificado de FORSU e da solução de AOV puros.....	20
Tabela 7 - Caracterização do acidificado de soro de leite.....	21
Tabela 8 - Ensaios descontínuos e diferentes condições .....	22
Tabela 9 - Volumes de nutrientes para os ensaios batch (mL/ 100 mL de alimentação) .....	22
Tabela 10 - Constituintes alimentação de acidificado de FORSU em ensaios descontínuos.....	23
Tabela 11 - Caracterização do acidificado de soro de leite.....	23
Tabela 12 - Constituintes da alimentação de acidificado de soro de leite em ensaios descontínuos .....	24
Tabela 13 - Equações e $R^2$ das retas de calibração dos AOV.....	27
Tabela 14 - Tabela resumo da operação dos quatro SBR .....	45
Tabela 15 - Tabela resumo da fase de acumulação de PHA em ensaios batch .....	58
Tabela 16 - Conversão de CQO em PHA.....	59

## Abreviaturas

**AOV** Ácido Orgânico Volátil

**CQO** Carência Química de Oxigênio

**CQOs in** Carência Química de Oxigênio solúvel da alimentação

**CQOs out** Carência Química de Oxigênio solúvel do efluente de descarga

**DA** Digestão anaeróbia

**ETAR** Estação de Tratamento de Águas Residuais

**FORSU** Fração Orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos

**HB** Hidroxibutirato

**HV** Hidroxivalerato

**OD** Oxigênio Dissolvido

**PHA** Polihidroxialcanoato

**PHB** Polihidroxibutirato

**RU** Resíduos Urbanos

**SBR** *Sequencing Batch Reactor*

**SST** Sólidos Suspensos Totais

**SSV** Sólidos Suspensos Voláteis

# 1. Introdução

## 1.1. Tratamentos de resíduos e efluentes

Hoje em dia é impossível pensar num mundo sem certos bens essenciais como a água. A sociedade moderna sempre foi habituada a viver com este recurso e nunca sentiu realmente falta, mas com os consumos atuais, em breve poderemos vir a sentir uma crise em torno deste bem essencial. O consumo leva-nos ao tratamento, pois com uma taxa de utilização tão elevada, seria impensável imaginar que este recurso exista em abundância tal que não seja necessário recorrer a sistemas de tratamento.

Neste momento, recorremos a estações de tratamento de águas residuais (ETAR) para que se possa reutilizar as águas. Estas estações possuem tratamentos mecânicos, químicos e biológicos por onde passam as águas de saneamento, para que o produto final seja aceitável para o consumidor final e/ou meio ambiente. Entre esses tratamentos, há sempre partes que podem ser valorizadas a nível energético e/ou material. Neste caso as águas residuais possuem nutrientes essenciais a certos microrganismos sendo que estes podem dar origem a produtos de valor para a nossa sociedade. No que diz respeito a resíduos sólidos, estes são encaminhados para aterros sanitários mas também possuem bastante material de possível valorização, através da reciclagem, da valorização energética ou da compostagem.

## 1.2. Origem e importância dos plásticos

Os plásticos também se tornaram em elementos imprescindíveis desde a sua descoberta. Tendo a sua origem nos combustíveis fósseis, rapidamente ganhou utilidades dentro da sociedade. Desde a indústria alimentar até sacos de plástico, estamos dependentes deste derivado de petróleo. O mais comum é associarmos o petróleo aos combustíveis, mas existem inúmeros produtos que usamos diariamente que derivam diretamente do “ouro negro”. Com a escassez desta matéria-prima a ser um cenário presente, é urgente encontrar alternativas a produtos que usamos no nosso dia-a-dia para que não se chegue a um ponto sem retorno possível, sendo os próximos anos cruciais para encontrar uma solução viável a este problema.

### 1.3. Relação entre o tratamento de resíduos e a produção de produtos de valor acrescentado

Nos últimos anos, tem-se tentado dar uma resposta visando abranger estas duas problemáticas, sendo que com os avanços tecnológicos registados, têm-se encontrado vários tipos de soluções para responder/gerir este tipo de problema. As tecnologias de lamas ativadas têm sido bastante estudadas nos últimos anos, e baseiam-se na utilização de culturas mistas aeróbias para remoção de matéria orgânica e nutrientes dos efluentes. Esta tecnologia pode também ser utilizada para a obtenção de produtos de valor acrescentado como a produção de biopolímeros. Desta forma é conseguido um efluente tratado com uma baixa carga orgânica e, ao mesmo tempo, obter-se um produto de valor acrescentado, como os PHA (biopolímero). Este procedimento ainda não possui resultados rentáveis a nível económico para a indústria, mas espera-se que, com o desenvolvimento da tecnologia, seja possível introduzir este tipo de tratamento a nível industrial, reduzindo assim a poluição e criando valor.

### 1.4 Objetivos

No âmbito da realização desta dissertação foram delineados os seguintes objetivos a cumprir:

- Desenvolvimento e seleção de culturas mistas capazes de produzir e armazenar biopolímeros (PHA), recorrendo a dois tipos de substratos orgânicos: resíduos/subprodutos industriais como a FORSU e o soro de leite;
  - Estudar várias condições para a seleção de culturas mistas para produção de PHA em reatores SBR, recorrendo a dois substratos acidificados em estudo;
- Acumulação de PHA por culturas selecionadas numa fase prévia e alimentadas com os dois substratos em estudo (FORSU e soro de leite);
  - Testar a acumulação de PHA das culturas selecionadas recorrendo a ensaios descontínuos com os dois substratos acidificados anaerobiamente.



## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Atualidade da gestão de resíduos

Hoje em dia enfrentamos um grande problema relativamente à gestão de resíduos. Em 2012, a quantidade de resíduos urbanos produzidos em Portugal foi de 4,8 milhões de toneladas, o que é equivalente a 34% do total de resíduos produzidos. Dos resíduos urbanos produzidos, 2% foram encaminhados para valorização multimaterial, 16% para valorização orgânica, 18% para valorização energética e os restantes 54% foram encaminhados diretamente para aterro (PERSU 2020, 2014).

Com a chegada do PERSU 2020 ganhou-se uma nova visão sobre a gestão de resíduos em Portugal sendo que uma das diretrizes principais é “Promover a prevenção e a gestão de resíduos integrada no ciclo de vida dos produtos, centrada numa economia tendencialmente circular e que garanta uma maior eficiência na utilização dos recursos naturais” (APA, 2014)

Ainda neste documento, há referência ao 7º Programa de ação em Matéria de Ambiente para a Prevenção e Gestão de Resíduos cujos os objetivos traçados passavam por:

- Transformar os resíduos num recurso;
- Reduzir a produção de resíduos per capita e a produção de resíduos em termos absolutos.
- Limitar a valorização energética aos materiais não recicláveis;
- Suprimir gradualmente a deposição em aterros, erradicando a deposição de materiais recicláveis ou valorizáveis;
- Assegurar uma reciclagem de alta qualidade;
- Desenvolver mercados para as matérias-primas secundárias (PERSU 2020, 2014).

Segundo o Projeto de Plano Nacional de Gestão de Resíduos (PNGR) baseia-se numa estratégia para a gestão dos resíduos e apresenta dois objetivos estratégicos e oito objetivos operacionais. Os objetivos estratégicos passam por promover a eficiência da utilização de recursos naturais na economia e prevenir ou reduzir os impactes adversos decorrentes da produção e gestão de resíduos. No âmbito dos objetivos operacionais tem-se: prevenir a produção e a perigosidade de resíduos; consolidar e otimizar a rede de gestão de resíduos; promover o fecho dos ciclos dos materiais e o aproveitamento da energia em cascata; gerir e

recuperar os passivos ambientais; fomentar a cidadania ambiental e o desempenho dos agentes; adequar e potenciar o uso dos instrumentos económicos e financeiros; adequar e agilizar os processos administrativos e fomentar o conhecimento do setor numa lógica de ciclo de vida (PERSU 2020, 2014).

#### 2.1.1. Composição dos RU em Portugal

No que respeita à composição física, os resíduos urbanos são constituídos por vários tipos de materiais e produtos em fim de vida. A figura 1 representa as frações que os compõem, onde os materiais biodegradáveis assumem especial relevo e integram os bio-resíduos, os resíduos verdes (recolhidos em separado), o papel/cartão e as embalagens de cartão para alimentos líquidos (ECAL), que em conjunto representam cerca de 55%, em peso dos resíduos urbanos (PERSU 2020, 2014).

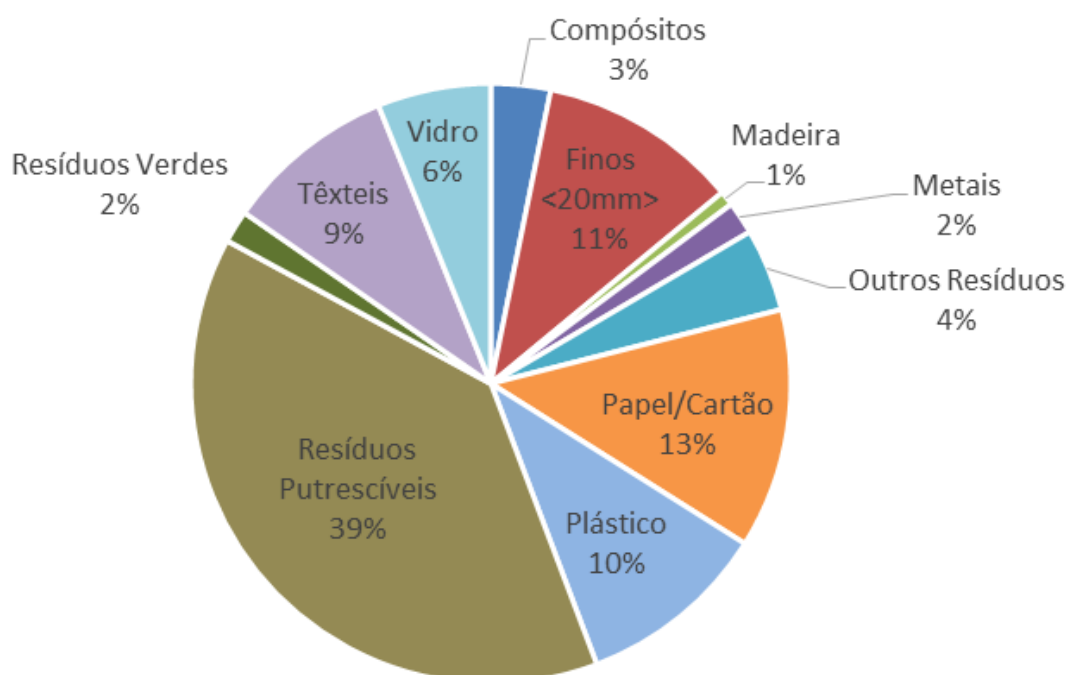


Figura 1 - Composição física média dos RU produzidos em Portugal Continental, no ano 2012 (PERSU 2020, 2014)

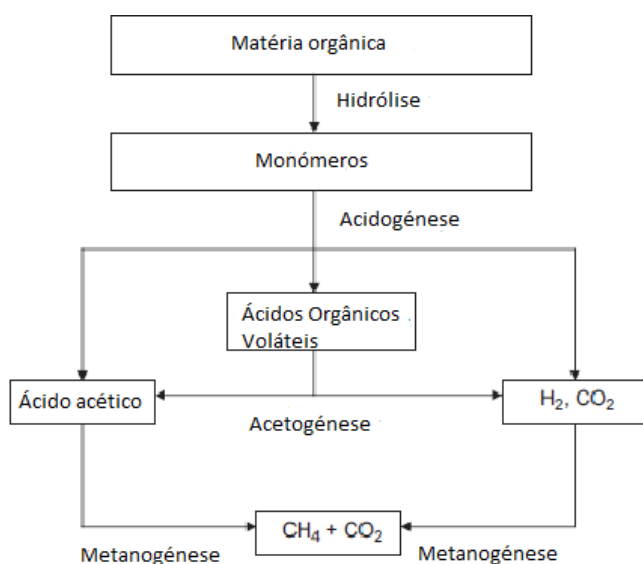
#### 2.1.2. Tipos de valorização energética/ material

Os resíduos que dão entrada em aterros apresentam características que permitem um tipo de valorização para além da sua deposição. Para além da reciclagem, uma grande parte são resíduos orgânicos que podem ou ser encaminhados para compostagem e deste modo produzir um substrato com elementos essenciais para agricultura e jardinagem (processo aeróbio), ou apenas através da sua deposição e selagem pode ser obtido metano através da formação de biogás, por processos naturais. Para além destes dois métodos existe ainda a aplicação do processo de digestão anaeróbia, para produção de biogás.

#### 2.1.2.1 Digestão Anaeróbia

A digestão anaeróbia, é um processo interessante na medida em que se consegue uma redução de poluição e, ao mesmo tempo, obtém-se uma recuperação de energia, que pode ser aplicado a diversos resíduos provenientes da agricultura e indústria dado serem ideais para este processo devido aos seus elevados níveis de materiais biodegradáveis (Chen et al., 2008).

A Digestão anaeróbia de matéria orgânica dá-se em quatro fases: hidrólise, acidogénese, acetogénese e metanogénese (Chen et al., 2008), como esquematizado na figura 2. Ao longo deste processo vão-se formando compostos intermédios que podem ser recuperados e valorizados, como os ácidos orgânicos voláteis (AOV), o hidrogénio e, em ultima instância, o metano.



*Figura 2 - Fases do processo de Digestão Anaeróbia (adaptado de Appels et al., 2008)*

Na fase de hidrólise a matéria orgânica insolúvel e compostos de elevado peso molecular como lípidos, polissacarídeos, proteínas e ácidos nucleicos são degradados em matéria orgânica solúvel (aminoácidos e ácidos orgânicos). Estes compostos formados na hidrólise passam pelo processo de acidogénese sendo convertidos em compostos mais simples. Os ácidos orgânicos voláteis (AOV) são produzidos por bactérias acidogénicas (ou fermentativas) assim como a amónia,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  entre outros intermediários. A terceira fase da digestão anaeróbia é a acetogénese, onde os ácidos orgânicos complexos e álcoois produzidos na fase de acidogénese são digeridos de modo a produzir ácido acético,  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2$ . Na fase final da DA (metanogénese) é produzido metano por dois grupos de bactérias metanogénicas: o primeiro degrada o acetato em metano e dióxido de carbono e o segundo usa o hidrogénio como dador de eletrões e dióxido de carbono como recetor para produzir metano (Lee et al., 2014; Silva et al., 2013).

Ao longo do processo há parâmetros que precisam de ser controlados de modo a conseguir um bom desempenho do processo de digestão. Entre os parâmetros que afetam este processo encontra-se o pH, a alcalinidade, o rácio AOV/alcalinidade, a temperatura, o tempo de retenção de sólidos (TRS) e o tempo de retenção hidráulica (TRH) (Lee et al., 2014).

Cada grupo de microrganismos possui uma gama ótima de pH. As bactérias metanogénicas são extremamente sensíveis a variações de pH, tendo como gama ótima os valores entre 6,5 e 7,2. As bactérias fermentativas (ou acidogénicas) possuem uma gama mais abrangente situando-se entre pH 4 e 8,5. Para valores de pH mais baixos produzem principalmente ácido acético e ácido butírico, enquanto que para pH 8 os ácidos produzidos a níveis mais elevados são acético e propiónico (Boe, 2006). Os AOV produzidos tendem a reduzir o pH, embora haja um controlo de pH por parte da atividade das bactérias metanogénicas, que produzem alcalinidade na forma de dióxido de carbono, amónia e bicarbonato (Appels et al., 2008).

A temperatura tem também um efeito importante nas propriedades físico-químicas dos compostos encontrados no processo de digestão anaeróbia, também influenciando o crescimento e metabolismo dos microrganismos no reator anaeróbico. As gamas ideais de temperatura são de 30 a 38 °C para bactérias mesófilas e 49 a 57 °C para bactérias termófilas (Silva, 2013).

Outros parâmetros importantes são o TRS e o TRH. O TRS é o tempo médio que os sólidos permanecem no digestor, enquanto que o TRH é o tempo médio que o efluente líquido fica dentro do reator. Um decréscimo no TRS implica numa redução nas reações do processo e vice

versa. Por exemplo TRS inferiores a 5 dias são insuficientes para uma digestão completa. Entre 5 e 8 dias, as concentrações de AOV são relativamente altas e compostos complexos como lípidos não são completamente decompostos em substâncias mais simples. Entre 8 e 10 dias, as concentrações de AOV são baixas e há degradação de lípidos. Para TRS superiores a 10 dias, todos os compostos são praticamente transformados (Appels et al., 2008).

Durante este processo também podem existir inibidores que podem influenciar a digestão anaeróbia:

- Inibidores metabólicos - Amónia – acredita-se que concentrações inferiores a 200 mg/L são benéficas para o processo de digestão anaeróbia pois o azoto é um nutriente essencial para os microrganismos anaeróbios (Liu and Sung, 2002). Durante o tratamento de efluentes contendo grandes concentrações de azoto na forma de amónia, o pH afeta o crescimento dos microrganismos (Kroeker et al., 1979; Hashimoto, 1983, 1984; Hansen et al., 1999), sendo que a formação de  $\text{NH}_4^+$  causa um aumento do pH e aumenta ao mesmo tempo o nível de toxicidade. Ao nível da temperatura, esta afeta diretamente o crescimento microbiano e a concentração de amónia: um aumento de temperatura resulta num efeito positivo no metabolismo, mas também faz aumentar os níveis de amónia no meio.
- Inibidores fisiológicos – os compostos fenólicos apresentam-se como os principais inibidores fisiológicos
- Inibidores bactericidas – A elevada concentração de ácidos gordos complexos pode levar a um decréscimo da população bacteriana, funcionando assim como bactericidas (Appels et al., 2008).

## 2.2. Tratamento aeróbio

### 2.2.1. Reatores aeróbios do tipo SBR

O reator SBR (sequencing batch reactor) pode ser aplicado e otimizado para o enriquecimento do crescimento de comunidades microbianas produtoras de PHA. Este tipo de reator possui os seguintes pontos fortes: uma retenção de biomassa eficiente; distribuição homogénea de substrato, produtos e biomassa dentro do reator (não utiliza outra unidade para o processo de separação de sólidos); operação e condições estáveis sobre condições limitantes do substrato (Jetten et al., 1998).

No âmbito deste trabalho, o ponto crucial para otimizar a produção de PHA por culturas mistas passa pela maximização da pressão seletiva imposta no enriquecimento das culturas, partindo de reatores SBR (Albuquerque et al., 2013).

O reator SBR é um reator sequencial, utilizando lamas aeróbias. Este sistema funciona por ciclos: primeiramente é fornecido um substrato que serve de alimentação às lamas aeróbias; após a entrada da alimentação no reator o sistema de arejamento começa a funcionar, fornecendo oxigénio necessário à biomassa para consumo do substrato; no fim do ciclo, ocorre uma paragem no sistema de arejamento e consequente deposição das lamas, sendo posteriormente retirado parte do volume do reator (efluente decantado com carga inferior à inicial), para que o processo recomece.

A figura seguinte ilustra o funcionamento de um reator SBR, exemplificando o seu ciclo de operação, como descrito anteriormente.

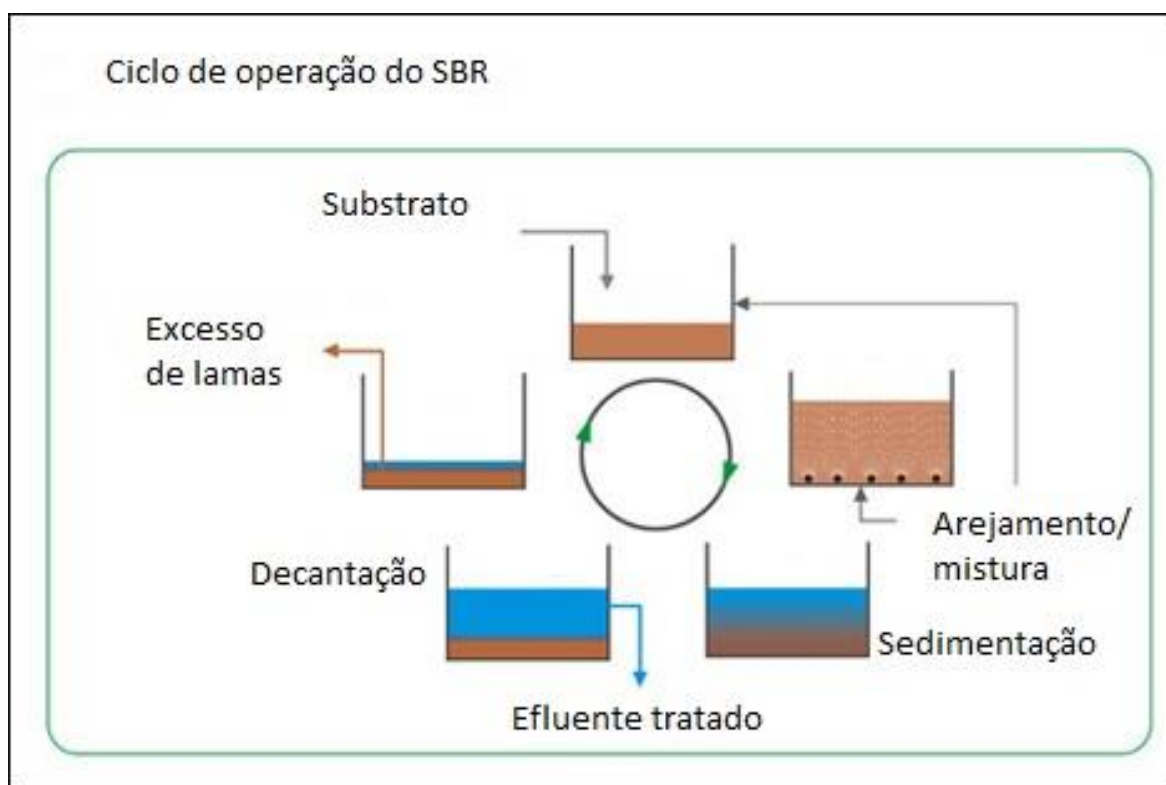


Figura 3 - Ciclo de operação do SBR

Para além das condições operacionais, as lamas funcionam segundo a estratégia de Fome/Fartura. Esta condição é controlada através dos perfis de oxigénio e consiste no seguinte: aquando da entrada da alimentação no reator, os níveis de oxigénio sofrem uma depleção para valores mínimos, indicando que as lamas estão a utilizar o oxigénio para o consumo do substrato -

Fartura; assim que termina o substrato, começa-se a verificar uma subida do teor de oxigénio dissolvido (OD) – Fome.

Esta estratégia de Fome/Fartura leva à seleção de culturas com níveis de acumulação de biopolímero elevados, através da utilização de ciclos de maior duração (Johnson et al., 2009).

Durante este processo a biomassa consome o substrato fornecido, onde parte serve como fonte de energia, o restante é armazenado como biopolímero. Durante a fase de Fome, as culturas podem utilizar o carbono armazenado sobre forma de PHA, como fonte de energia.

É de salientar que durante este regime, é obrigatório que a fase de Fome tenha uma duração maior, relativamente à de fartura, o que possibilita uma seleção dos microrganismos melhores acumuladores de polímero. Estudos por Singh Saharan et al. (2014) demonstraram que a longa duração da fase de Fome é a principal causadora da redução de componentes intracelulares como RNA e enzimas, impulsionadoras do crescimento celular.

As lamas ativadas, utilizadas como inóculo neste processo, não são mais que uma mistura complexa de sólidos suspensos inertes, vários tipos de microrganismos e material extracelular. O estudo das características físicas das lamas ativadas é dificultado pelo fato destes microrganismos se encontrarem sempre em mudança/ adaptação das suas características (Örmeci et al., 2000).

Um sistema de lamas ativadas também apresenta alguns factores que influenciam o seu funcionamento: características do efluente a tratar, características ambientais (incluindo temperatura), presença de substâncias tóxicas ou inibidoras, oxigenação do sistema ou condições operacionais (TRS, TRH ou características das lamas) (Hreiz et al., 2015).

#### 2.2.1. Culturas puras vs. Culturas mistas

Neste trabalho serão utilizadas culturas mistas de microrganismos. A razão pela qual são utilizadas culturas mistas ao invés de culturas puras baseia-se no fato das culturas mistas não necessitarem de um ambiente esterilizado e conduzirem a um melhor rácio de PHA/ AOV consumidos e possuírem também taxas de acumulação mais rápidas (Kourmentza et al., 2009).

A utilização de culturas mistas facilita o uso de substratos mais complexos, pelo que a adaptação é mais rápida e a seleção dá-se a partir dos que apresentam maior capacidade de armazenamento de PHA (Valentino et al. 2013).

O uso de culturas puras tem benefícios como a capacidade de acumulação de PHA de 90%, mas requer condições estéreis ao longo do processo, daí os custos serem tão elevados (Serafim et al., 2008; Marang et al., 2013). Utilizando culturas mistas consegue-se reduções de custos em termos de substrato bem como de operação (Reis et al., 2003), sendo que o único entrave encontrado relativamente às culturas mistas ser a ser menor estabilidade relativamente às culturas puras, embora seja possível usar a mesma cultura no período de aproximadamente 2 anos (Serafim et al., 2008).

A nível industrial, com recurso a culturas puras e em que os substratos utilizados são açúcares puros (glucose e sacarose), provoca um elevado custo no produto final, produzindo biopolímeros com valores inoportáveis que podem chegar aos 8€/kg para polihidrobutilato (PHB), não apresentando valores competitivos economicamente relativamente aos plásticos de origem fóssil - 1€/kg (Reis et al., 2003).

A utilização de culturas mistas, torna-se viável pois existe uma elevada competitividade entre as bactérias presentes, em que as que registam melhor acumulação de PHA têm vantagem no período de seleção levando à criação de uma cultura em que só estão presentes as que apresentam maiores capacidades de acumular PHA. Assim é possível a obtenção de uma cultura praticamente pura, com a vantagem de não necessitar de condições estéreis (Johnson et al., 2009). Com custos de produção entre os 3 e os 4 €/kg de PHA, a nível económico apresenta uma vantagem em relação às culturas puras (Akaraonye et al., 2010).

### 2.2.3. Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV)

Com o aumento populacional e do consumo tem-se verificado um aumento nos resíduos produzidos. De modo a combater este problema têm-se procurado soluções de modo a reduzir a poluição e ao mesmo tempo obter subprodutos provenientes dos resíduos gerados. Os AOV são ácidos gordos de cadeia curta (com 6 ou menos carbonos) e possuem aplicações como a produção de biopolímeros e de bioenergia, assim como remoção de nutrientes de águas residuais. Devido a apresentarem baixos custos de produção, os ácidos orgânicos voláteis (AOV) obtidos a partir da fermentação acidogénica de vários tipos de resíduos tem sido alvo de diversos estudos,



podendo ser fornecidos como substratos a microrganismos produtores de biopolímeros e bioenergia, assim como serem usados como precursores no tratamento de efluentes com remoção de nutrientes. A composição dos AOV pode ser afetada não apenas pela composição do substrato que lhes dá origem (no processo de digestão anaeróbia) e nas características biológicas do inóculo utilizado, mas também por fatores ambientais, tais como TRH, temperatura, presença de metais (funcionam como inibidores), poder de oxidação ou mesmo o pH. A produção destes ácidos orgânicos voláteis pode ser feita a partir dos mais variados resíduos, com os resíduos orgânicos e FORSU a serem dos mais utilizados (Bengtsson et al., 2008; Gameiro et al., 2015; Lee et al., 2014; Vergine et al. 2015).

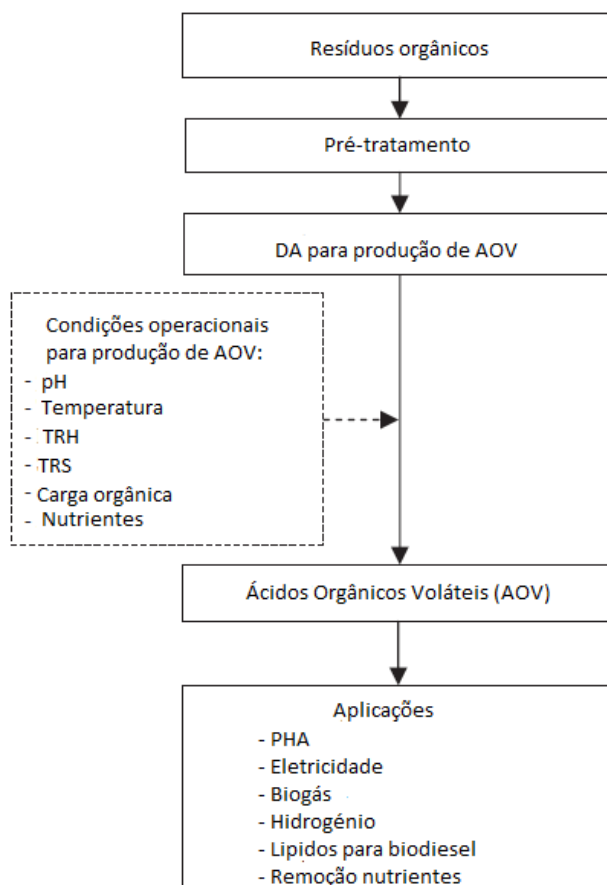


Figura 4 - Processo de produção de AOV e potenciais aplicações (adaptado de Lee et al. (2014))

A figura 4 é representativa do processo de produção de AOV e as suas potenciais aplicações, entre as quais se destacam:

- PHA – A partir de culturas puras ou mistas é possível que estas acumulem o biopolímero, através do fornecimento de um substrato rico em AOV. As culturas puras apresentam melhores rendimentos na produção de PHA, mas devido aos custos envolvidos serem

elevados, tende-se a optar por culturas mistas que, em condições operacionais otimizadas e fornecendo substratos com elevados teores de AOV, podem-se obter acumulações consideráveis.

- Bioenergia – utilização de AOV, na digestão anaeróbia, ou mesmo pela produção de biogás, hidrogénio ou biodiesel.
- Eletricidade – Através do uso de células microbianas, recorrendo a reações químicas, quando na presença de um substrato orgânico. Esta técnica não necessita de qualquer tipo de tratamento para gerar este tipo de energia, sendo uma opção interessante, principalmente a nível económico.
- Biogás – Os AOV funcionam como um precursor na produção de biogás, em condições anaeróbias, embora o uso de uma fase anaeróbica com recurso a AOV não seja o melhor método de produção de biogás (Lee et al., 2014). A solução passa por um sistema composto por 2 digestores, em que o primeiro é operado a um pH ácido com um TRS curto (ideal para bactérias acidogénicas) e um segundo a um pH neutro com um TRS superior (ambiente propício para as bactérias metanogénicas) tal como nas fases da DA.
- Hidrogénio – Recorrendo à foto-fermentação, bactérias não-sulfúricas convertem os AOV em hidrogénio, na presença de luz; eletrohidrólise, em que o uso de corrente elétrica fornece eletrões que em conjunto com os prótons gerados da eletrohidrólise dos AOV produz hidrogénio; por último, o uso de células microbianas de eletrólise que produzem hidrogénio a partir da oxidação microbiana dos AOV
- Lípidos para produção de biodiesel – através de microrganismos oleaginosos que usam os AOV para sintetizar lípidos, produzindo ácidos gordos com composição idêntica aos utilizados na produção de biodiesel
- Remoção de nutrientes – os AOV são utilizados como fonte externa de carbono para os microrganismos que efetuam a remoção de azoto e fósforo de efluentes. Por vezes não existe uma fonte de carbono para que estes microrganismos consigam remover estes nutrientes em quantidade suficiente e a presença de AOV é crucial no processo (Lee et al., 2014).

### 2.3. Biopolímeros

Os biopolímeros fazem parte de uma categoria de polímeros originários de processos biológicos, entre os quais se encontram os polihidroxialcanoatos (PHA).

### 2.3.1 O que são os polihidroxialcanoatos (PHA)?

Os polihidroxialcanoatos são polímeros acumulados por diversos grupos de bactérias que os usam como fonte de energia e carbono. Alguns deles são similares aos plásticos com origem no petróleo como os polipropilenos e são totalmente biodegradáveis (Marang et al., 2013).

Os polihidroxialcanoatos fazem parte da família dos biopolíésteres e têm havido esforços para a sua comercialização, embora sem sucesso até ao momento. A sua produção deu-se nos anos 80, com varias empresas a apostar na sua produção, de modo a combater o aumento do preço do petróleo (Cheng, 2009).

Existem três tipos de plásticos biodegradáveis: os fotodegradáveis, os semi-biodegradáveis e os de completa biodegradabilidade. Os primeiros degradam-se através de longa exposição à luz ultravioleta e os segundos são parcialmente degradados por bactérias sendo a matéria não degradável correspondente a polietileno. Os últimos, aos quais pertencem os PHA, são totalmente biodegradáveis. Devido à sua não degradabilidade, os plásticos de origem fóssil apresentam uma desvantagem em termos ambientais relativamente aos PHA (Reddy et al., 2003).

A nível económico os plásticos convencionais ganham vantagem devido ao processo de produção de PHA ser, no mínimo, entre 3 e 4 vezes mais dispendioso, sendo que o objetivo no futuro é tornar os biopolímeros competitivos economicamente.

Na Tabela 1 é possível observar algumas estirpes produtoras de PHA para diferentes tipos de fontes de carbono utilizadas como substrato. No estudo de cada estirpe é fornecido um tipo de substrato, sendo indicado qual o polímero acumulado pela cultura, bem como as suas percentagens em peso seco por volume (mg de polímero/mL).

Tabela 1 - Bactérias utilizadas para produção de PHA com diferentes substratos (Reddy et al., 2003)

ESTIRPE	FONTE DE CARBONO	TIPO DE POLÍMERO	PHA (% peso seco/volume)	Referências
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Gluconato	PHB	46-85	Liebergesell et al. (1994)
	Propionato	PHB	26-36	
	Octanato	PHB	38-45	
<i>Bacillus Megaterium</i> QMB1551	Glucose	PHB	20	Mirtha et al. (1995)
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinantes	Melaço	PHB	65	Zhang et al. (1994)
<i>Methylobacterium rhodesianum</i> MB 1267	Frutose/ metanol	PHB	30	Ackermann and Babel (1997)
<i>M. extorquens</i> (ATCC55366)	Metanol	PHB	40-46	Borque et al. (1995)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Óleo de rícino	PHA	20-30	Eggink et al. (1995)
<i>P. denitrificans</i>	Metanol	P(3HV)	0,02	Yamane et al. (1996)
	Pentanol	P(3HV)	55	
<i>P. oleovorans</i>	Glucanoato	PHB	1,1-5	Liebergesell et al. (1994)
	Octanoato	PHB	50-68	
<i>P. putida</i> GPp104	Octanoato	PHB	14-22	Liebergesell et al. (1994)
<i>P. putida</i>	Óleo de palma	PHA	37	Tan et al. (1997)
	Ácido Laurico	PHA	25	
	Ácido Mirístico	PHA	28	
	Ácido Oleico	PHA	19	
<i>P. putida</i> BM01	Ácido 11-fenoxi dodecanóico	5POHV	15-35	Song and Yoon (1996)
<i>Sphaerotilus natans</i>	Glucose	PHB	40	Takeda et al.

#### 2.3.1.1. Co-polímeros

O PHA que tem sido mais alvo de estudos tem sido o poli-3-hidroxibutirato (PHB). Este apresenta grande fragilidade, o que torna a sua utilização mais complicada em aplicações que necessitem de um material com maior flexibilidade (Braunegg et al., 1998). Devido ao pequeno intervalo entre a temperatura de decomposição (270 °C) e o ponto alto de fusão (180 °C), o seu manuseamento torna-se dificultado. De modo a superar esse problema procede-se à interrupção da matriz cristalina de PHB através da adição de diferentes monómeros de PHA, nomeadamente o 3-hidroxivalerato (3HV) ou com uma cadeia quiral, como o 4-hidroxibutirato (4HB). Desta forma obtêm-se assim co-polímeros que permitem obter uma melhoria das propriedades mecânicas dos materiais para uma maior gama de aplicações (Arroja et al., 2012)

#### 2.3.2. Formas de produção de PHA

Através do uso de culturas mistas, alimentadas com uma mistura de ácidos orgânicos voláteis como o ácido acético, o ácido propiónico e o ácido butírico, é possível que estas culturas produzam PHA com os ácidos acético e butírico a revelarem melhores resultados na formação de polihidroxibutirato (PHB) e o ácido propiónico na obtenção do co-polímero HB:HV com 51% de hidrovalerato (Fradinho et al., 2014).

Usando uma alimentação contínua, em vez de ser feita por fases pode-se obter até 8% mais da produção de hidrovalerato, induzindo uma redução no peso molecular, ponto de fusão e ainda uma redução no grau de cristalização de um semi-cristalino para uma matriz amórfica (Alburquerque et al., 2010).

Hoje em dia, os PHA produzidos a nível industrial acarretam preços elevados, devido não só ao uso de culturas puras como também de alimentações de alto custo, sendo que o custo do substrato representa cerca de 40% do custo de produção total destes biopolímeros (Reis et al., 2003).

#### 2.3.3. Aplicações do biopolímero

Os PHA são termoplásticos não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis. A estas características juntam-se também o fato de terem um elevado grau de polimerização, serem altamente cristalinos, opticamente ativos e isostáticos, piezoelétricos e insolúveis em água. Devido a todos estes atributos torna-os um concorrente interessante relativamente ao polipropileno.

Devido à sua resistência podem ter um grande tipo de aplicações, pois mantêm a sua forma original desde temperaturas como os -30º até valores que podem chegar aos 120 °C (Chen, 2009). Podem dar origem a produtos para embalagens, desde produtos alimentares a embalagens de produtos cosméticos devido às características acima referidas. Podem ainda ser utilizados nos invólucros biodegradáveis, para libertação controlada de medicamentos, adubos, fertilizantes, fungicidas, herbicidas e inseticidas. (Reddy et al., 2003).

A nível farmacêutico e medicina as suas aplicações são inúmeras destacando-se a cardiovascular, a medicina dentária, a regeneração de tecidos ou ossos, os implantes, o involucro de medicamentos, o reparo de nervos, os usos nutricionais e os ortopédicos, entre outros (Williams et al., 1996)

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Instalação laboratorial

No decorrer dos procedimentos experimentais para a realização deste trabalho foram utilizados dois tipos de reatores biológicos, dependendo da fase que estava a operar: numa primeira fase, em que foi realizada a seleção das culturas mistas produtoras de PHA, foram usados reatores sequenciais (SBR – *Sequential Batch Reactor*); na segunda fase utilizaram-se reatores descontínuos (*batch*) para testar a acumulação de PHA pelas culturas mistas selecionadas. Na primeira fase será descrito todo o processo da fase de seleção (reator utilizado, tipos de alimentação e monitorização efetuada) sendo os componentes da fase de acumulação explicados posteriormente.

#### 3.2. Reator sequencial (SBR)

Na primeira fase, foram utilizados reatores SBR (*Sequential Batch Reactor*) feitos em acrílico, com um volume útil de 5L. No início do processo, os reatores foram cheios com lamas aeróbias provenientes de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais Domésticas. Relativamente ao sistema de arejamento, foram usados difusores posicionados na parte interior do reator SBR, realizando assim uma agitação homogênea do conteúdo do reator, para além do fornecimento do oxigénio necessário ao processo.

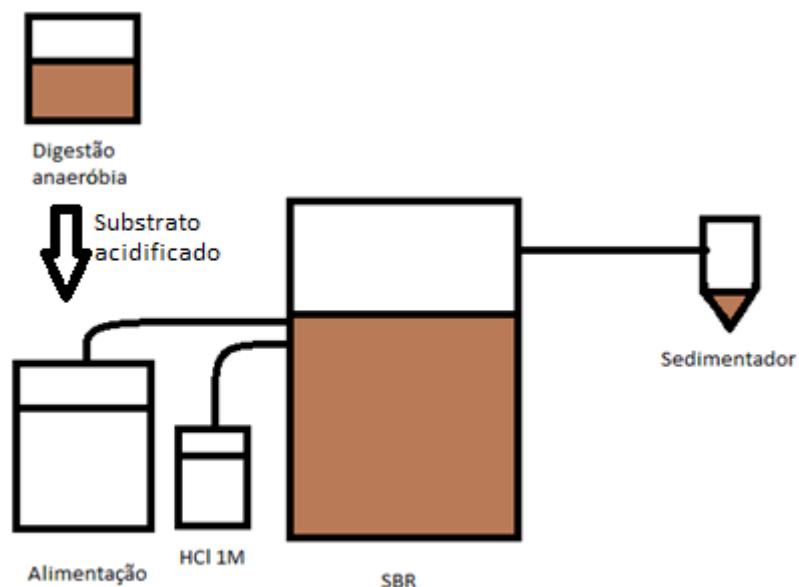


Figura 5 - Esquema de operação do SBR (Digestão anaeróbia não realizada neste trabalho)

Estes reatores funcionam por ciclos sendo o tempo total de 12h. Durante o ciclo faz-se a introdução de 0,5 L de alimentação (com um tempo de duração=18 min), ficando o tempo de reação de 11h10min, de forma a permitir que todos os ácidos orgânicos voláteis presentes na alimentação possam ser consumidos segundo o regime Fome/Fartura. De seguida ocorre um período de sedimentação de 30 min bem como a retirada de 0,5L da parte superior do reator (cerca de 18 min), garantindo assim a permanência da biomassa que se encontrava sedimentada no fundo do reator.

Na parte superior do reator encontravam-se as sondas de pH e de oxigénio. O pH era controlado por um sistema automático: quando se registavam valores de pH iguais ou superiores a 8, uma bomba peristáltica adicionava uma solução de ácido clorídrico (1M). Os valores medidos pela sonda de oxigénio dissolvido eram guardados num cartão de memória juntamente com os valores de pH, para um determinado período de tempo.

A tabela 2 apresenta os parâmetros operacionais a que os SBR foram sujeitos e as condições associadas.

*Tabela 2 - Condições de operação dos reatores SBR*

Reator	C.O. (g <sub>C<sub>60</sub></sub> /L.d)	SSV (g/L)	Alimentação	Rácio C:N:P
<b>SBR 1</b>	1	2	FORSU	100:7:1
<b>SBR 2</b>	1	2	Soro de leite	100:7:1
<b>SBR 3</b>	1	2	FORSU	100:5:1
<b>SBR 4</b>	1	2	Soro de leite	100:5:1

### 3.2.1. Alimentação dos SBR

Foram testados dois tipos de alimentação (substrato/ resíduo orgânico) para permitir uma comparação acerca de qual o melhor substrato a fornecer a este tipo de culturas mistas produtoras de PHA: FORSU e soro de leite acidificados obtidos por fermentação anaeróbia. Às duas alimentações eram adicionados os seguintes nutrientes para promover a produção de PHA e não o crescimento microbológico da cultura em si. As soluções stock de fósforo e azoto continham 100 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 100 g/L de NH<sub>4</sub>Cl, respetivamente. As tabelas seguintes ilustram as quantidades colocadas, em mL/ L de alimentação, de cada uma das soluções de nutrientes necessários, bem como as respetivas constituições.



Tabela 3 - Volumes nutrientes para as diferentes condições nos SBR (mL/ L de alimentação)

NUTRIENTE	RÁCIO C:P:N (100:7:1)	RÁCIO C:P:N (100:5:1)
SOLUÇÃO AMÔNIA	7,7	5,5
SOLUÇÃO FOSFATO	2,8	2,8
MEIO MINERAL	22	22
MICRO NUTRIENTES	2,2	2,2

Tabela 4 - Constituintes do Meio Mineral

CONSTITUINTES MEIO MINERAL	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5000
EDTA	150
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2500
TIOUREIA	1000
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100

Tabela 5 - Constituintes da solução de Micronutrientes

CONSTITUINTES MICRONUTRIENTES	CONCENTRAÇÃO (mg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	150
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	100
ZnCl <sub>2</sub>	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	25
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	5
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	10
KI	15

### 3.2.1.1. Acidificado de FORSU

Para as alimentações aos reatores foi utilizada uma bomba peristáltica (Watson-Marlow 101UR), tendo-se procedido à sua prévia calibração para que fosse debitado o caudal pretendido. Esta alimentação foi obtida a partir da fermentação anaeróbia de FORSU (Fração Orgânica de Resíduos Sólidos Urbanos). Como havia vários recipientes com FORSU acidificada foi realizada uma caracterização de cada um da concentração de AOV e da carência química de oxigénio, de modo a escolher o recipiente com o acidificado mais adequado para a alimentação que se ia fornecer aos SBR. Após as análises verificou-se que a quantidade de AOV presente em todos os recipientes era insuficiente para aplicar neste estudo, nos reatores SBR, de modo a garantir a

carga orgânica desejada, pelo que se optou por adicionar uma solução de ácidos puros (ácido acético, ácido propiónico e ácido n-butírico). Assim foi preparada uma solução de AOV em que foram utilizados os seguintes volumes para uma solução de 5 L: 50 mL de ácido acético, 25 mL de ácido propiónico e 50 mL de ácido n-butírico.

A tabela seguinte ilustra as concentrações de AOV e as respetivas concentrações em CQO presentes no recipiente selecionado e na solução de ácidos orgânicos voláteis (AOV) puros.

*Tabela 6 - Caracterização do acidificado de FORSU e da solução de AOV puros*

		Acidificado de FORSU	Solução de AOV puros
Concentração AOV (mg/L)	Ácido Acético	90,85	11510,85
	Ácido Propiónico	17,98	4193,94
	Ácido i-Butírico	0,092	0
	Ácido n-Butírico	0,37	6923,35
	Ácido i-Valérico	0	0
	Ácido n-Valérico	0	0
	Ácido Capróico	0	0
Concentração total AOV (mg/L)		109,29	22628,14
Concentração CQO dos AOV (mg <sub>CQO</sub> /L)		124,99	31218,36
pH		7,83	Não registado

Após a determinação das concentrações de AOV de cada uma das soluções, e para aplicar uma carga orgânica aos SBR de 1 g<sub>CQO</sub>/L.d, foram efetuados cálculos para obter o volume de cada solução: por cada litro de alimentação foram adicionados 160 mL da solução de AOV puros, 805 mL de FORSU acidificado e os restantes 35 mL correspondiam à adição das soluções de nutrientes.

### 3.2.1.2 Acidificado de soro de leite

O procedimento é o mesmo que utilizado para a alimentação com acidificado de FORSU. Após caracterização dos diversos recipientes de soro de leite acidificado escolheu-se o que apresentava uma maior concentração de AOV. Ao contrário do verificado para o acidificado da FORSU, não foi necessário acrescentar AOV puros pois o recipiente selecionado possuía uma concentração suficiente de AOV.

A tabela seguinte indica as concentrações de AOV e o respetivo CQO referentes ao recipiente de acidificado de soro de leite selecionado.

*Tabela 7 - Caracterização do acidificado de soro de leite*

		Acidificado de soro de leite
Concentração AOV (mg/L)	Ácido Acético	167,08
	Ácido Propiónico	276,35
	Ácido i-Butírico	47,08
	Ácido n-Butírico	1776,05
	Ácido i-Valérico	61,14
	Ácido n-Valérico	350,55
	Ácido Capróico	444,64
Concentração total AOV (mg/L)		3122,89
Concentração CQO dos AOV (mg <sub>CQO</sub> /L)		5731,89

Para a preparação da alimentação deste acidificado era utilizado, por litro, 875 mL de acidificado de soro de leite, 90 mL de água destilada e o restante perfazia-se com as soluções de nutrientes necessários.

### 3.3. Ensaio em reatores descontínuos para acumulação de biopolímero

Na segunda fase do trabalho foram realizados 11 ensaios em reatores descontínuos. Para a realização destes ensaios foram utilizados copos de vidro de 500 mL (correspondente ao volume útil) tendo sido introduzido 400 mL de lamas selecionadas previamente nos ensaios em SBR da fase anterior com uma concentração aproximadamente de 2 g<sub>ssv</sub>/L. Os restantes 100 mL introduzidos seriam de alimentação, em que se variaram diversas condições (tabela 8). Nestes ensaios não foi adicionada amónia, na solução de nutrientes colocados na fase da seleção de culturas, pois esta promove o crescimento da biomassa e neste caso pretende-se é que ocorra acumulação de PHA pela biomassa. A quantidade de amónia presente nos *batch* pode-se considerar não significativa, pois provem apenas da fase de seleção, em níveis residuais. O arejamento era feito através da introdução de uma tubagem, na parte superior, o que permitia uma agitação no reator para além de fornecer oxigénio às culturas aeróbias previamente selecionadas nos reatores SBR.

Tabela 8 - Ensaios descontínuos e diferentes condições

Batch	Proveniência inóculo	Alimentação	Condição	
			pH (na alimentação)	Carga orgânica (AOV)
B0	SBR 2	FORSU	pH 5	1 g <sub>CQO</sub> /L.d
B1	SBR 1		pH 10	
B2				
B3	SBR 2	Soro leite	pH 5	
B4			pH 10	
B5	SBR 1	FORSU	Sem ajuste	2 g <sub>CQO</sub> /L.d
B6				3 g <sub>CQO</sub> /L.d
B7	SBR 2	Soro leite		2 g <sub>CQO</sub> /L.d
B8				3 g <sub>CQO</sub> /L.d
B9	SBR 3	FORSU		2 g <sub>CQO</sub> /L.d
B10	SBR 4	Soro leite		

### 3.3.1. Alimentação dos reatores descontínuos

Para a alimentação dos reatores descontínuos para produção de PHA foram na mesma utilizados os dois tipos de acidificado (acidificado de FORSU e acidificado de soro de leite) e adicionando as soluções de nutrientes anteriormente descritas, com exceção da solução de amônia como foi indicado anteriormente.

Tabela 9 - Volumes de nutrientes para os ensaios batch (mL/ 100 mL de alimentação)

NUTRIENTE	VOLUME (mL)
FOSFATO	0,28
MEIO MINERAL	2,2
MICRO NUTRIENTES	0,22

#### 3.3.1.1. Acidificado de FORSU

A preparação foi idêntica à feita para a alimentação dos SBR, a diferença seria nas quantidades de base e da solução de AOV puros a utilizar para as diferentes cargas. Na tabela seguinte constam os volumes adicionados em cada alimentação.

*Tabela 10 - Constituintes alimentação de acidificado de FORSU em ensaios descontínuos*

	<b>Preparação da alimentação de acidificado de FORSU (mL/100 mL de alimentação)</b>		
	Carga orgânica 1 g <sub>CQO</sub> /L.d	Carga orgânica 2 g <sub>CQO</sub> /L.d	Carga orgânica 3 g <sub>CQO</sub> /L.d
<b>Solução AOV puro</b>	16	32	48
<b>Base</b>	81,3	65,3	49,3
<b>Nutrientes</b>	2,7		

### 3.3.1.2 Acidificado de soro de leite

Da mesma forma que para a alimentação de FORSU, os nutrientes e os respetivos volumes utilizados são os mesmos, mas para as diferentes cargas foi adicionado, ou não, volume da solução de AOV puros preparada anteriormente. Como nesta altura já tinha sido esgotado o recipiente de acidificado de soro de leite selecionado na primeira fase, pelo que foi necessário realizar uma nova caracterização de outro recipiente a ser utilizado na alimentação. Na tabela seguinte são apresentadas as concentrações de AOV e de CQO associadas aos AOV do novo recipiente.

*Tabela 11 - Caracterização do acidificado de soro de leite*

		<b>Acidificado de soro de leite</b>
<b>Concentração AOV (mg/L)</b>	Ácido Acético	178,25
	Ácido Propiónico	263,61
	Ácido i-Butírico	0,55
	Ácido n-Butírico	0,17
	Ácido i-Valérico	1,20
	Ácido n-Valérico	0
	Ácido Capróico	0
<b>Concentração total AOV (mg/L)</b>		443,78

<b>Concentração CQO dos AOV (mg<sub>CQO</sub>/L)</b>	593,05
--	--------

Para a alimentação dos reatores descontínuos referentes ao acidificado de soro de leite, recorreu-se à mesma estratégia utilizada na alimentação com acidificado da FORSU: juntar a base com a solução de AOV puros. Então para as diferentes cargas eram adicionados diferentes volumes. Na tabela seguinte encontra-se especificado os volumes utilizados para cada carga.

*Tabela 12 - Constituintes da alimentação de acidificado de soro de leite em ensaios descontínuos*

	<b>Preparação da alimentação de acidificado de soro de leite (mL/100 mL alimentação)</b>		
	Carga orgânica 1 g <sub>CQO</sub> /L.d	Carga orgânica 2 g <sub>CQO</sub> /L.d	Carga orgânica 3 g <sub>CQO</sub> /L.d
<b>Solução AOV puro</b>	14,5	31	47
<b>Base</b>	82,8	66,3	50,3
<b>Nutrientes</b>	2,7		

### 3.4. Monitorização dos sistemas biológicos

Como referenciado anteriormente era feito uma monitorização de níveis de oxigénio e de pH pelas sondas introduzidas na parte superior dos reatores, sendo o parâmetro da temperatura nunca controlado.

Foi analisada a carência química de oxigénio (CQO) e os Ácidos Orgânicos Voláteis (AOV) à entrada e saída dos reatores SBR e no início e fim dos reatores *batch* de modo a garantir o bom funcionamento do processo.

Parâmetros como Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV) foram analisados duas vezes por semana (coincidindo com a preparação de uma nova alimentação nos reatores SBR) de modo a controlar o crescimento microbiológico da cultura.

### 3.5. Métodos analíticos

#### 3.5.1. Carência Química de Oxigênio (CQO)

A Carência Química de Oxigênio (CQO) foi medida segundo o método de refluxo fechado (método 5220-B) com determinação espectrofotométrica baseado no protocolo do “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater” (APHA, 2005), tendo sido realizadas 3 réplicas para cada amostra.

Efetuuou-se uma digestão das amostras durante 2 horas num termobloco Aqualytic, modelo AL38, a uma temperatura de 150 °C com dicromato de potássio (para a oxidação da matéria orgânica), ácido sulfúrico (para acidificação do meio) e sulfato de prata. A solução é composta por 2,5 mL de amostra, 1,5 mL de solução de dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ) contendo sal de mercúrio ( $HgSO_4$ ) e 3,5 mL ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) com sulfato de prata ( $Ag_2SO_4$ ).

Após a digestão das amostras, estas foram arrefecidas à temperatura ambiente, para posterior determinação por espectrofotometria (Aqualytic, modelo PCH023212) da quantidade de dicromato de potássio que não reagiu.

O calculo da concentração de  $CQO_{solúvel}$  foi efetuado aplicando a forma descrita em (1)

$$CQOs \left( \frac{gCQO}{L} \right) = \frac{1}{f.d.} * abs \quad (1)$$

Em que o f.d. é o fator de diluição aplicado à amostra e abs é a absorvância da amostra digerida, lida no espectrofotómetro.

#### 3.5.2. Sólidos Suspensos Totais (SST) e Sólidos Suspensos Voláteis (SSV)

Os SST e SSV foram determinados segundo as diretrizes do protocolo “Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater”, métodos 2540-B, 2540-D e 2540-E (APHA, 2005). Os cadinhos com os filtros de microfibra de vidro (Reeve Angel™ grade 403) foram previamente calcinados durante 1 hora a 550 °C numa mufla Thermolab™ Fuji PXR-9 e após o seu arrefecimento num exsicador foram pesados em balança analítica Precisa XB120. Após pesagem foi filtrado um determinado volume e levados à estufa (WTC Binder E28), durante 24h. Para determinação de SST é efetuada nova pesagem após os cadinhos passarem 24 horas na estufa a 105 °C. Após a pesagem, os cadinhos são colocados na mufla a 550 °C durante 2 horas sendo posteriormente arrefecidos no exsicador para que seja efetuada nova pesagem para determinação de SSV. O valor de SSV nas amostras corresponde à concentração de biomassa no

reator. As amostras foram efetuadas em triplicado. As equações (2) e (3) foram utilizadas para determinar os SST e os SSV presentes nas amostras:

$$SST \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{\text{massa (cadinho+filtro +resíduo seco)}[g] - \text{massa (cadinho+filtro)}[g]}{V_{\text{amostra}} [mL]} * 1000 \quad (2)$$

$$SSV \left[ \frac{g}{L} \right] = \frac{\text{massa (cadinho+filtro +resíduo seco)}[g] - \text{massa (cadinho+filtro+resíduo calcinado)}[g]}{V_{\text{amostra}} [mL]} * 1000 \quad (3)$$

### 3.5.3. Monitorização dos níveis de oxigénio e pH

Na medição dos níveis de oxigénio foi utilizado uma sonda *InPro 6800* da Mettler Toledo em cooperação com o software próprio para o registo das variáveis em estudo (oxigénio dissolvido e pH), o qual era medido por um transmissor Alpha DO 2000 da Thermo Scientific.

Por sua vez o pH é monitorizado por um controlador/transmissor Alpha pH 1000 da Thermo Scientific que funciona com um eletrodo de pH da Plyclave. O pH das amostras retiradas ao reator foi medido com um instrumento portátil Consort C-515, ao qual estava associado um eletrodo de pH de xerolite.

### 3.5.4. AOV

Para medição dos ácidos orgânicos voláteis, nomeadamente o acético, propiónico, i-butírico, n-butírico, i-valérico, n-valérico e caproico utilizou-se um cromatógrafo Clarus 480 da Perkin Elmer (instrumento especializado em cromatografia gasosa), uma coluna SGE (25m x 0,53mm) ID-BPI 5,0 µm, em que as injeções são realizadas a um volume fixo de 0,5 µL da amostra recolhida em eppendorf, filtrada e conservada em ácido fórmico (1:10). O método utilizado no cromatógrafo inicia com a temperatura de 70°C durante o período de 1 min, sendo seguido de uma rampa de 20°C/ min até atingir o patamar 100°C, temperatura na qual se mantém por 2 min. Após esse período de tempo reinicia a subida de temperatura, com outra rampa de 10°C/min até atingir os 140°C mantendo-se durante 3 min. Dos ácidos referenciados em cima apenas foi possível contabilizar o acético, o propiónico e o n-butírico pois foram os únicos que se encontravam presentes nas alimentações efetuadas e, consequentemente, nas saídas do reator. Os dados recolhidos do cromatograma são convertidos em mg/L através das respetivas curvas de calibração.



Foi efetuada uma calibração prévia com padrões de concentração conhecida, usando AOV puros comerciais de modo a obter as retas de calibração para cada um dos ácidos. A figura 6 ilustra as diversas retas de calibração para cálculo das concentrações de AOV de cada amostra. Abaixo será apresentada a tabela 12 que apresenta a equação de cada uma das retas bem como o  $R^2$  correspondente.

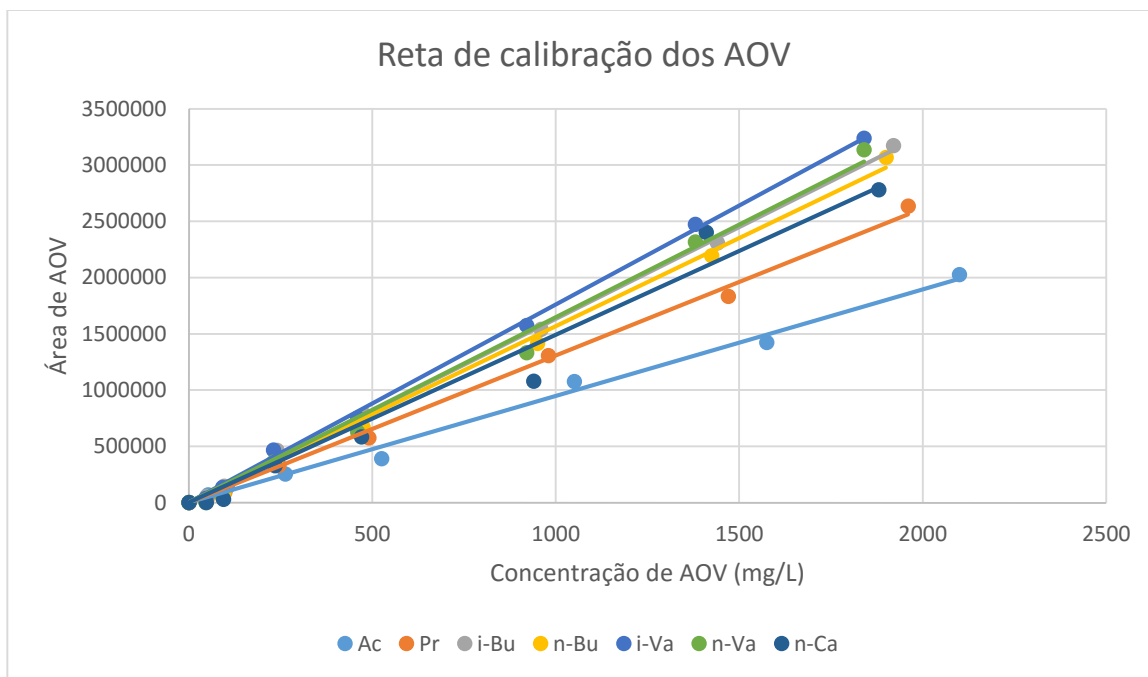


Figura 6 - Curvas de calibração para os AOV em estudo

Tabela 13 - Equações e  $R^2$  das retas de calibração dos AOV

	Acético	Propiônico	i-Butírico	n-Butírico	i-Valérico	n-Valérico	n-Capróico
Equação	946,98x	1306,8x	1631,5x	1566,9x	1760x	1647,6x	1490,7x
$R^2$	0,9933	0,9969	0,9989	0,9966	0,9987	0,9918	0,9736

A partir das retas de calibração e tendo as áreas de cada um dos ácidos fornecida pelo programa do cromatógrafo, determinou-se através do declive da reta de calibração de cada ácido o valor da concentração.

### 3.5.5. PHA

No caso dos PHA utilizou-se um cromatógrafo gasoso *Clarus 480* da *Perkim Elmer* com uma coluna SGE BP20 (WAX) 60 m x 0.32mm x 0.5  $\mu$ m. O protocolo seguido para

determinação de PHA teve como base o método adaptado de Serafim *et al.* (2004) e Lemos *et al.* (2006). As concentrações de Hidroxibutirato (HB) e Hidroxivalerato (HV) foram calculadas usando padrões de PHB-HV (88%-12% em base molar). Utilizou-se uma solução de Heptadecano (HD) em clorofórmio como padrão interno. O processo de preparação das amostras foi efetuada seguindo os seguintes passos: pesagem de um pellet de aproximadamente 2 mg num tubo de digestão e posterior adição de 1 mL de metanol ácido com 20% de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) (Fluka®); adição de 1 mL de padrão interno, cuja concentração de heptadecano (Sigma®) era de 10,293 mg/mL; durante 3 h 30 min, a amostra foi digerida a 100 °C num termobloco Seleta® DQ06. Após arrefecimento, adicionou-se 0,5 mL de água destilada e agitou-se em vórtex (VWR®) durante 1 minuto na velocidade máxima; após a separação das fases no interior do tubo, foi recolhido 0,8 mL da fase orgânica para o vial de cromatografia, cujos peneiros moleculares apresentavam um diâmetro de 0,3 mm (AlfaAesar®) para retenção da água remanescente no vial.

Relativamente ao programa de temperaturas utilizado no cromatógrafo para determinação da presença de PHA nas amostras recolhidas foi o seguinte: o programa realiza uma rampa de 16°C/min dos 50°C aos 100°C seguida de outra rampa a 9°C/min até aos 225°C onde se mantém nessa temperatura por um período de 3 min.

De modo a obter os valores de PHA acumulados pelas culturas mistas foi efetuada uma reta de calibração utilizando diversos padrões de concentração conhecida, usando o polímero puro comercial (sigma). A figura 7 ilustra a reta de calibração para o HB e a figura 4 apresenta a reta de calibração para o HV.

No processo é adicionado HD e é a partir da relação das áreas (HB:HD e HV:HD) que se faz a calibração para posterior conhecimento das concentrações.

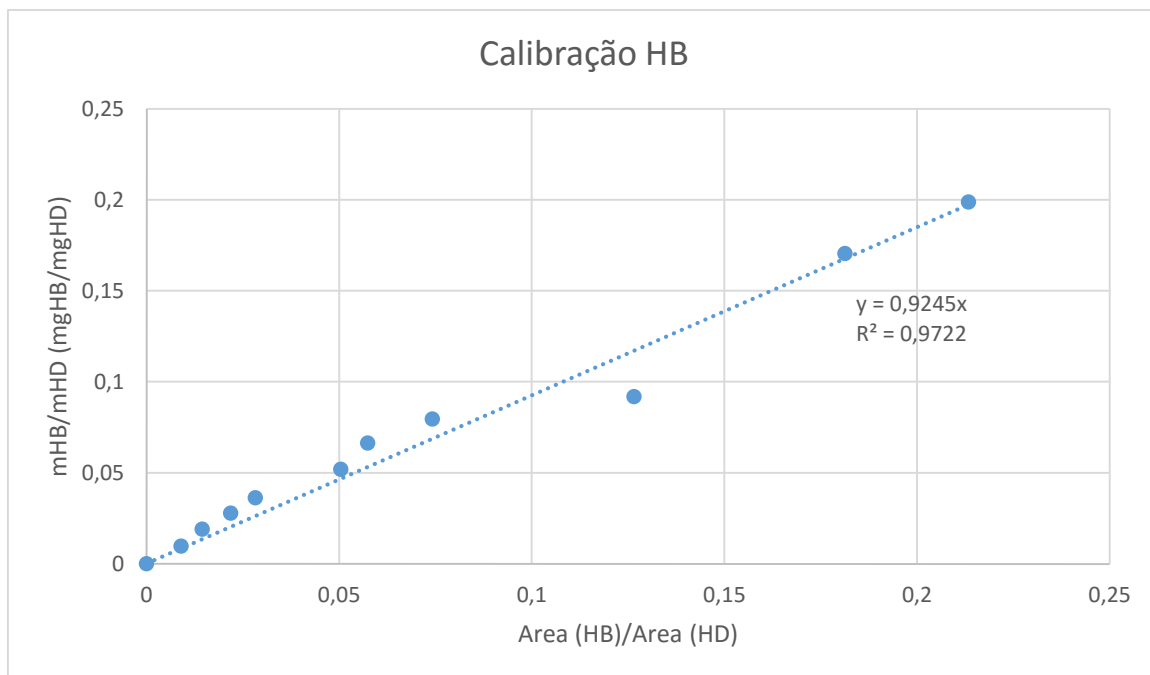


Figura 7 - Reta de calibração HB

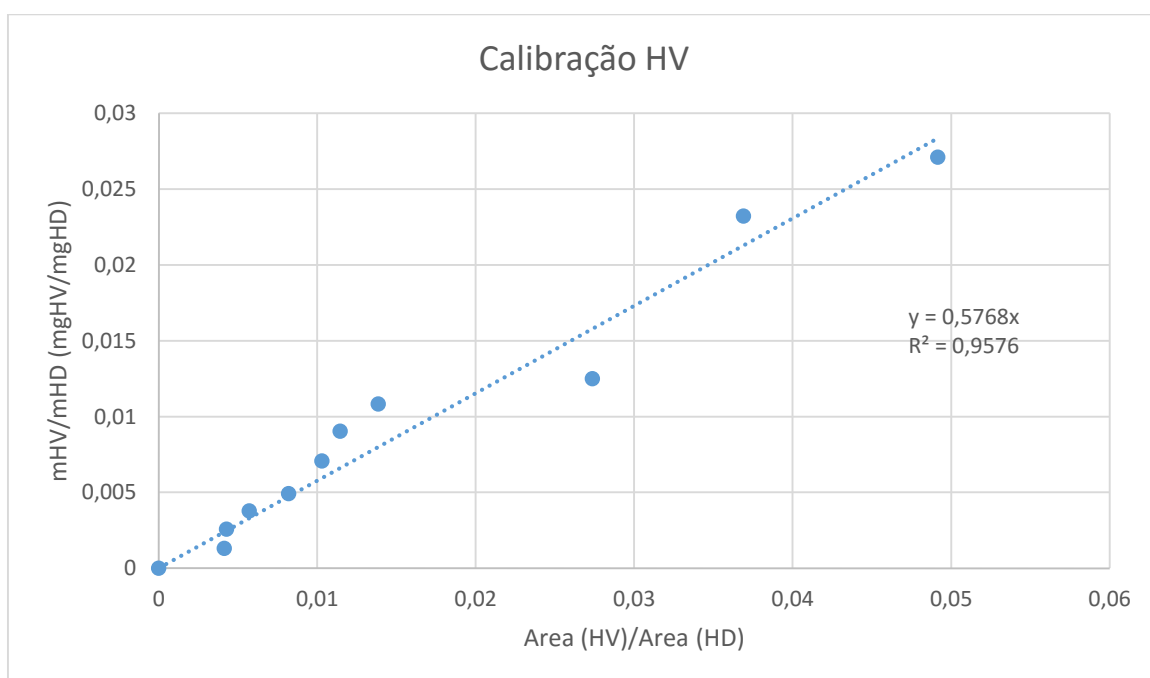


Figura 8 - Reta de calibração HV

## 4. Resultados e discussão

Neste capítulo serão discutidos os resultados da fase de seleção de culturas produtoras de PHA e da fase de acumulação de biopolímero, comparando o funcionamento dos reatores consoante as condições a que foram submetidos, de modo a obter uma análise acerca do efeito de cada condição no processo biológico.

### 4.1. Fase de seleção das culturas

De modo a cumprir os objetivos propostos anteriormente, nesta fase foram operados quatro SBR, cada um com diferentes condições operacionais. De seguida serão apresentados os resultados de performance dos reatores em questão comparando o tipo de alimentação e o efeito do rácio C:N:P.

#### 4.1.1. Fase fome/fartura

Na fase de seleção de culturas produtoras de PHA foram utilizadas culturas mistas e submetidas a uma condição que permite a seleção: regime fome/fartura. Esta condição pode ser controlada pelos perfis de oxigénio ao longo do ciclo de funcionamento. Basicamente, o perfil de oxigénio indica se as culturas estão a consumir substrato ou se já não se encontra substrato no meio. Quando se inicia a alimentação, a percentagem de oxigénio dissolvido (OD), encontrava-se no máximo, começando a baixar gradualmente para valores entre os 0 e 1%. Esta fase chama-se fartura, porque encontra-se substrato no meio para ser consumido. Assim que o substrato acaba, o oxigénio sobe até aos valores máximos. Caso a calibração da sonda de oxigénio esteja bem efetuada, chega-se a atingir valores a rondar os 100%. A esta fase atribui-se o nome de fome, pois é quando as culturas já consumiram todo o substrato do meio e recorrem ao polímero acumulado como fonte de energia. Na figura seguinte pode-se ver um perfil típico de oxigénio dissolvido em que é possível diferenciar as duas fases.

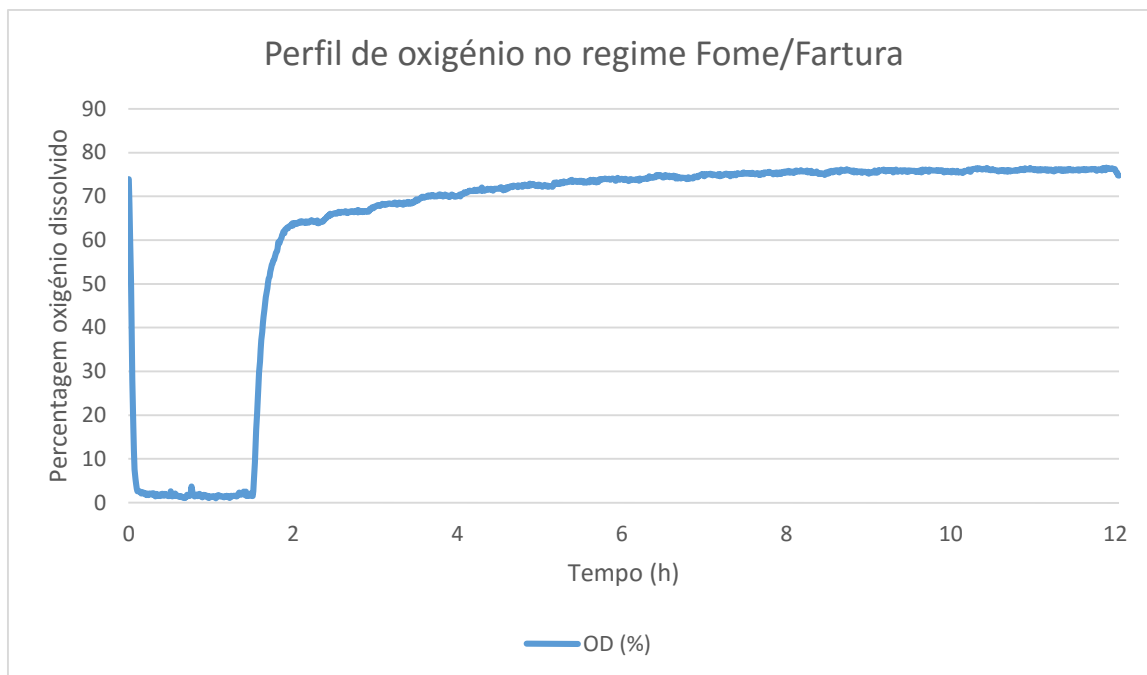


Figura 9 - Perfil de oxigênio dissolvido no regime Fome/Fartura

A figura 9 representa um dos ciclos do reator SBR 1. Como a carga orgânica aplicada e a concentração de biomassa nos quatro reatores (SBR 1, SBR 2, SBR 3 e SBR 4) foram as mesmas, os perfis de oxigênio para os diferentes reatores são idênticos. A carga aplicada a cada um dos reatores é de  $1g_{CQO}/L.d$ , sendo que em cada ciclo eram introduzidos cerca de 2,5 g de CQO. No final de sensivelmente 1h30 todo o substrato tinha sido consumido. Na figura 9 é possível identificar as duas fases: a primeira (Fartura) que ocorre entre as 0h e 1h30. Nesta fase o oxigênio tem uma descida abrupta até os seus valores mínimos, dando-se o consumo do substrato introduzido no reator. Aquando do fim do substrato regista-se uma subida do oxigênio dissolvido até valores a rondar os 75%, indicando que todo o substrato tinha sido assimilado. Neste trabalho foram utilizados ciclos de 12 horas para determinar se a duração de ciclo influencia ou não a seleção e acumulação de PHA pelas culturas mistas.

De modo a conhecer o comportamento das culturas mistas ao longo de cada ciclo, foi realizado um estudo de vários parâmetros, de modo a estudar o que acontece no regime fome/fartura. Assim pretende-se verificar o que acontece ao perfil de oxigênio, aos AOV presentes no meio e aos níveis de acumulação de PHA. A figura seguinte ilustra o desenvolvimento desses três parâmetros ao longo de um ciclo. Este estudo foi realizado no reator SBR 4, com uma carga orgânica de  $1g_{CQO}/L.d$  e uma duração de 12 horas.

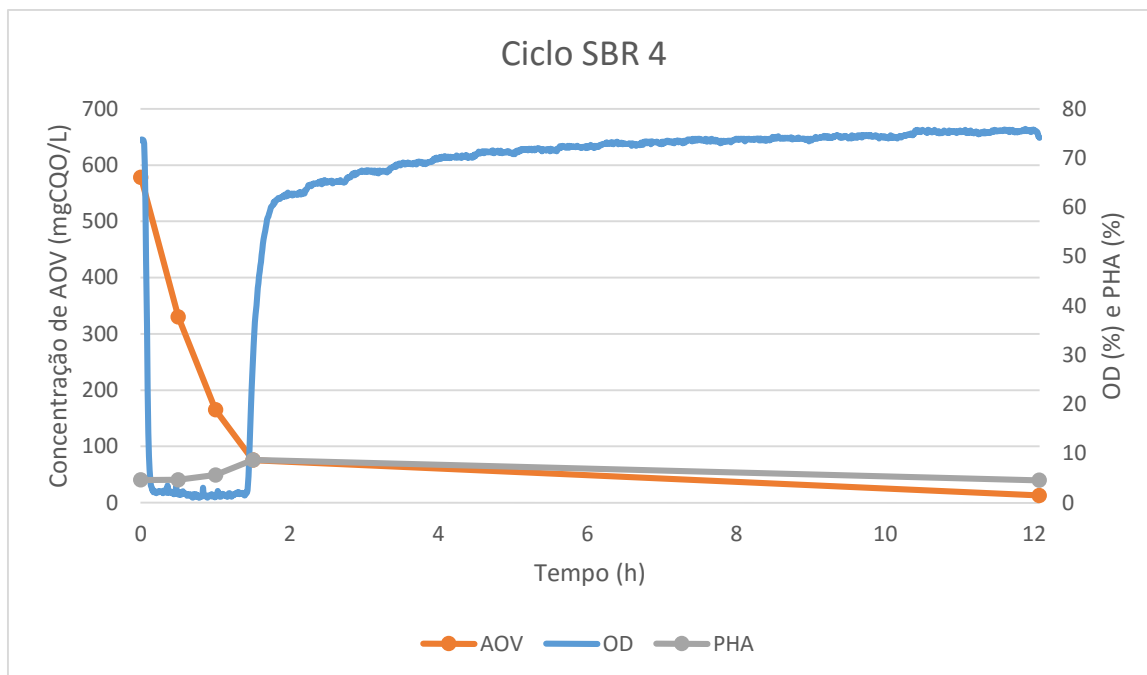


Figura 10 - Ciclo SBR 4

Como podemos verificar pela figura acima, os valores de AOV e OD variam inversamente. Numa primeira fase, em que é introduzida a alimentação, a concentração de AOV encontra-se no seu máximo, neste caso aproximadamente 2,5 g/L. Ao final de 30 minutos a concentração de AOV presente no reator diminui mais de 40%, não se registando grande elevação no valor de PHA acumulado. O máximo de polímero é atingido na altura em que o oxigénio dissolvido começa a subir, registando 8,66%, ainda havendo cerca de 13% de AOV provenientes da alimentação. No final do ciclo regista-se o valor mínimo de concentração de AOV e os valores de polímero presente no interior das células baixa para valores pouco inferiores às iniciais, o que implica que na fase de fome as culturas, na falta de substrato recorrem ao PHA como fonte de energia, consumindo quase metade do polímero acumulado. De forma a maximizar os valores de acumulação de PHA, deve-se obter o polímero logo após a elevação dos níveis de oxigénio dissolvido, de modo a que as culturas não usem como forma de sobrevivência. Visto que grande parte do ciclo as culturas se encontram em fase de fome, deve-se alterar alguma das condições para que não consumam o polímero nesse período. Uma das estratégias poderá passar por aplicar uma carga superior para que o tempo de consumo se estenda, reduzir a duração total do ciclo e/ou redução de concentração de biomassa no interior do reator. A aplicação de algum deste tipo de condições poderá ajudar a maximizar o processo.

#### 4.1.2. Desempenho dos reatores na fase de seleção

Os SBR 1 e 2 ocorreram em paralelo, o mesmo acontecendo com a seleção das culturas nos SBR 3 e 4 de modo a garantir que ambas as culturas se encontravam em estados semelhantes para a fase de acumulação em reatores descontínuos. Este período durou cerca de 3 semanas, no final do qual já se encontravam aptas ao substrato de que lhes tinha servido de alimentação para que na fase seguinte se pudesse obter uma maior produção de polímero. É de assinalar que a carga orgânica ajustada anteriormente refere-se apenas à carga orgânica em ácidos orgânicos voláteis ( $1 \text{ g}_{\text{CQO}}/\text{L.d}$ ) havendo carência química de oxigénio na alimentação referentes à base (FORSU e Soro de leite) embora em valores residuais. No que diz respeito à escolha do soro de leite acidificado para servir de alimentação foram analisados diversos recipientes com diferentes características na sua produção para determinar qual desses acidificados se adequavam melhor a servir de alimentação aos SBR 2 e 4. Como tanto nas análises aos acidificados de soro de leite como ao acidificado da FORSU, todos apresentavam valores de carência química de oxigénio relativamente baixos, o que foi posteriormente comprovado aquando da verificação da ausência de AOV nos acidificados (análises no cromatógrafo deram nulas em AOV). Posteriormente à preparação de cada alimentação eram adicionados três tipos de ácidos orgânicos voláteis (ácido acético, ácido propiónico e ácido n-butírico). A estes ácidos está associado uma carência química de oxigénio, por isso deu-se preferência a acertar os níveis de carga orgânica consoante a adição destes ácidos. No geral as cargas orgânicas aplicadas a cada um dos reatores rondaram os  $1,1 \text{ g}_{\text{CQO}}/\text{L.d}$ , valor similar ao pretendido. Não foram feitas análises à carência química de oxigénio solúvel nas alimentações pois prévias análises comprovaram que o CQO solúvel representava praticamente a totalidade do CQO (cerca de 99%). Foram criados os SBR 3 e 4 para se poder variar a condição C:N:P. Para lamas aeróbias o valor de rácio recomendado é de 100:5:1 (Ammery, 2004). Nesta situação foram testadas duas condições: a primeira segundo o que tem sido realizado em trabalhos anteriores e a segunda segundo a literatura suplementar consultada.

##### *i. Alimentação de acidificado de FORSU (efeito rácio C:N:P)*

Nos reatores SBR 1 e SBR 3, foi adicionado um teor de biomassa de  $2 \text{ g}_{\text{SSV}}/\text{L}$ , e aplicada uma carga orgânica de  $1 \text{ g}_{\text{CQO}}/\text{L.d}$ . Nos gráficos seguintes será demonstrado o comportamento dos

reatores em termos de remoção de CQO, carga orgânica aplicada e crescimentos microbiológico da cultura, respetivamente. O período total de seleção foi de 23 dias.

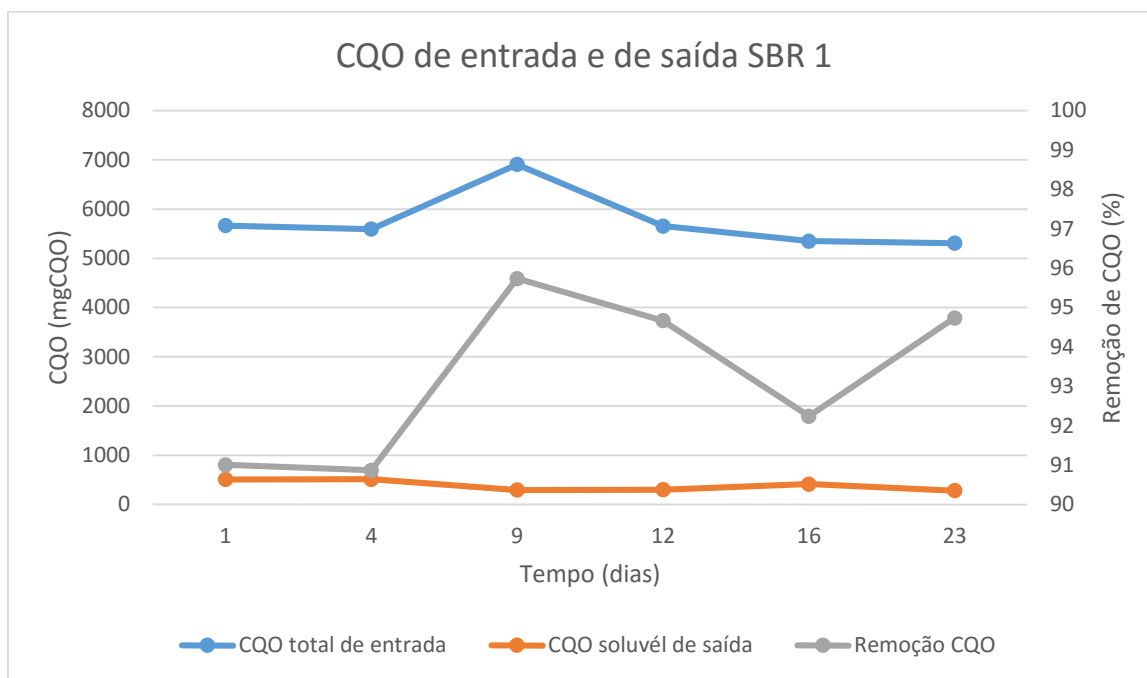


Figura 11 - Carência Química de Oxigénio SBR 1

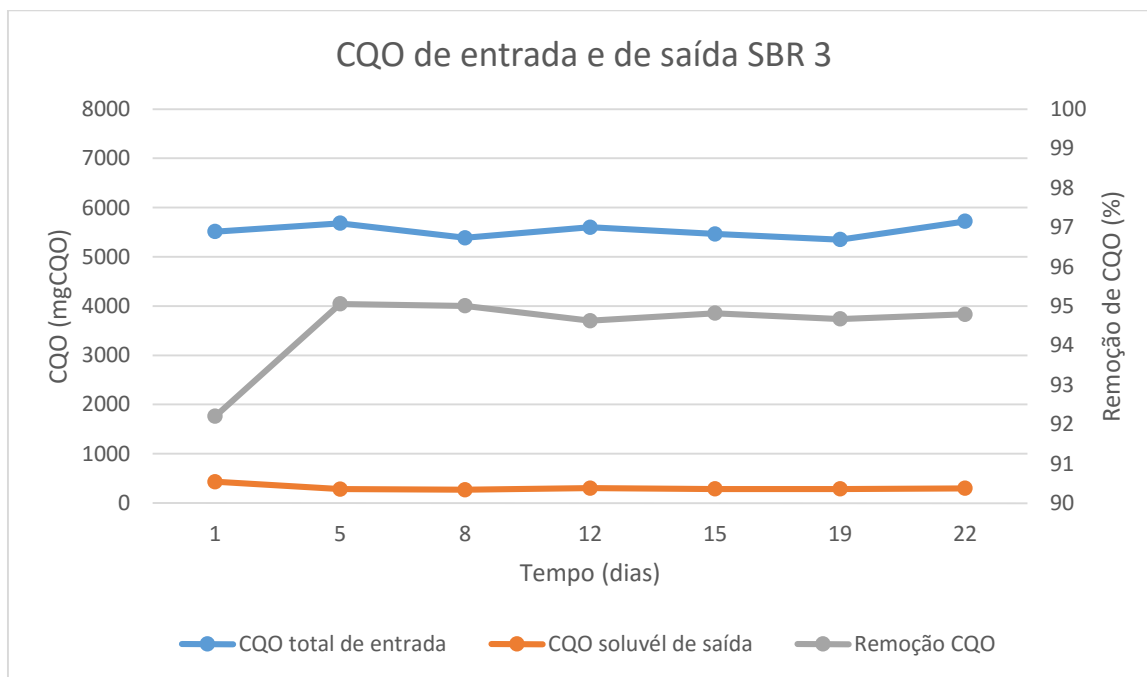


Figura 12 - Carência Química de Oxigénio SBR 3

Analisando os resultados obtidos para o SBR 1 e o SBR 3, ambos apresentam valores de remoção de CQO idênticos, embora no primeiro dia de operação do SBR 3 se verifique um valor



de remoção mais baixo. Quando as culturas se adaptaram ao substrato os valores de remoção mantiveram-se relativamente constantes entre os 94% e 95%. No caso do SBR 1 também apresenta alguma variação ao longo do tempo mas os níveis de remoção encontram-se dentro da mesma gama atingindo um máximo de 95,73%.

No gráfico 13 é possível verificar as variações de carga orgânica aplicada para o SBR 1 e o SBR 3. Verifica-se que não apresenta grande variância à exceção do dia 9 de operação do SBR 1 que se aproximou de 1,4 g<sub>CCO</sub>/L.d sendo corrigida na alimentação do dia seguinte. As cargas aplicadas variam entre 1 e 1,2 g<sub>CCO</sub>/L.d.

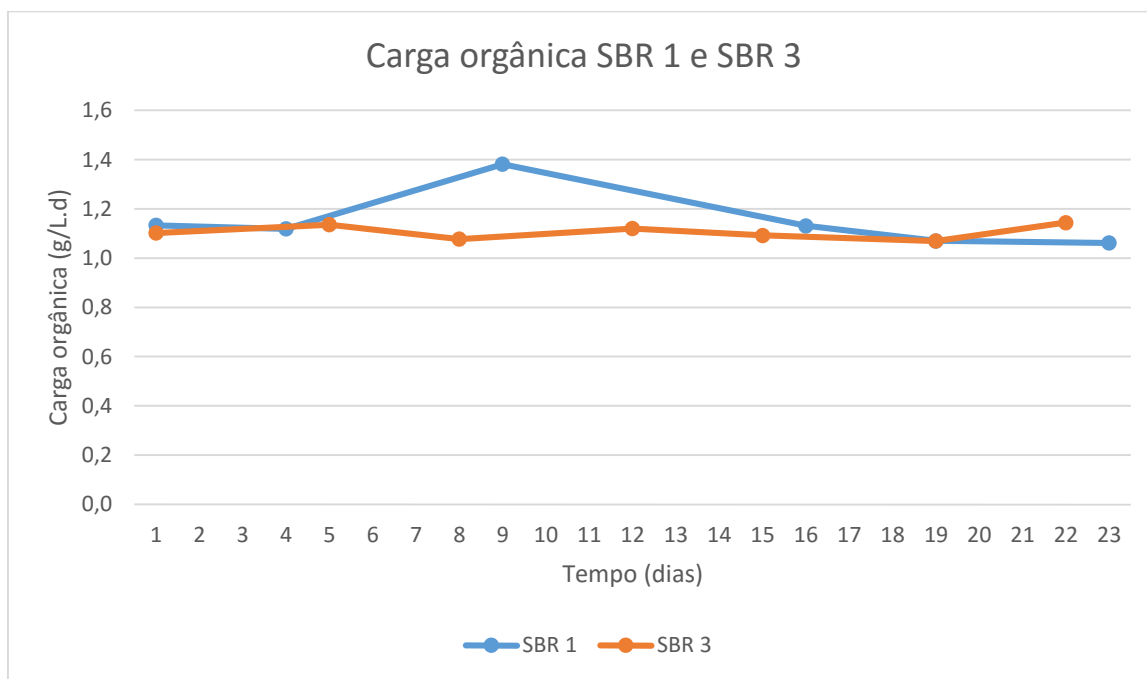


Figura 13 - Carga orgânica SBR 1 e SBR 3

As figuras seguintes apresentam os dados referentes ao crescimento das culturas mistas ao longo do período de seleção para SBR 1 e SBR 3, respetivamente.

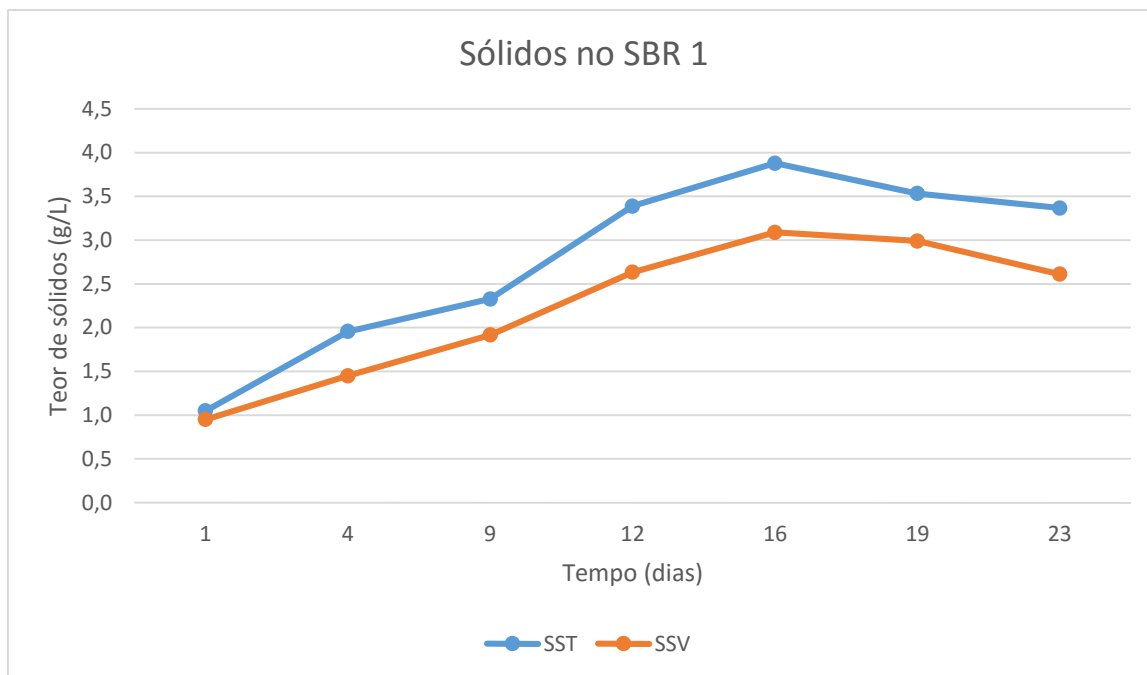


Figura 14 - Teor de biomassa SBR 1

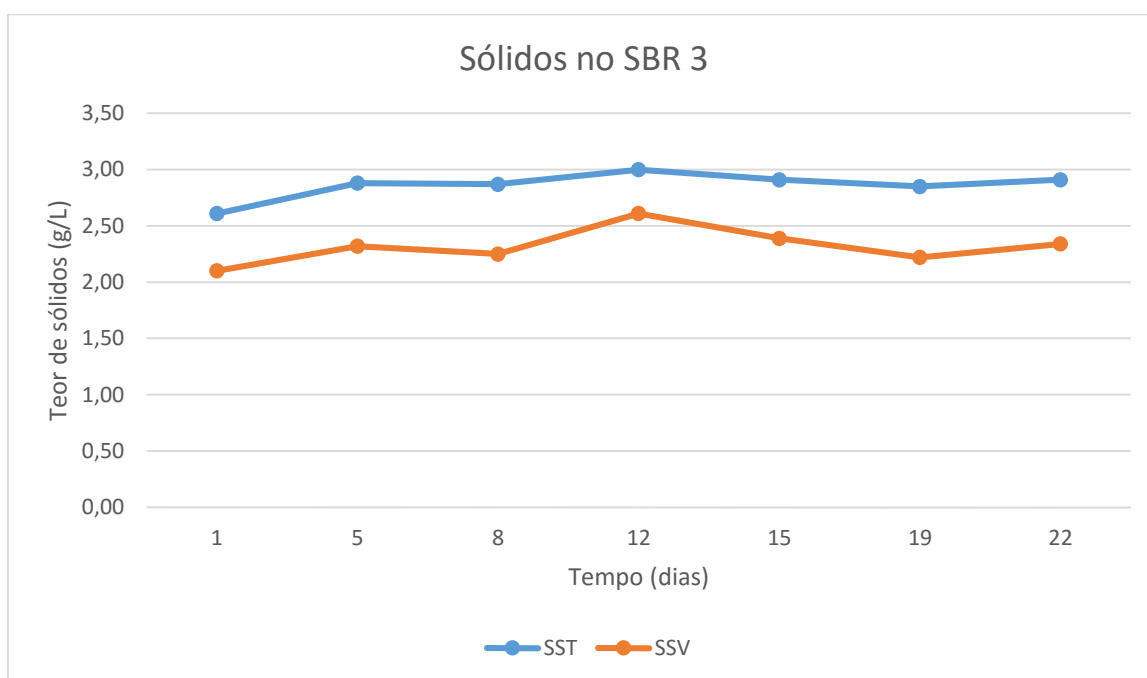


Figura 15 - Teor de biomassa SBR 3

Relativamente à evolução de biomassa no SBR 1, verifica-se um grande aumento sendo explicado por ajustes que foi necessário fazer a meio da operação com a adição de biomassa, dado se ter verificado que a sua concentração era baixa. Assim, após os primeiros resultados ao nível de teor de lamas dentro do SBR foram adicionadas mais lamas, tendo-se verificado uma

grande elevação no valor tendo posteriormente atingido valores à volta de 2,5 g/L. No SBR 3, a concentração de lamas não sofreu tantas variações como se pode verificar no gráfico.

Para este tipo de alimentação verifica-se que o rácio C:N:P de 100:7:1 regista um máximo nos valores de remoção de CQO mais elevado comparando com o rácio de 100:5:1, embora este último tenha apresentado um comportamento mais estável ao longo da fase de seleção, tanto em termos de remoção de CQO como de carga orgânica aplicada e teor de sólidos. Em termos de acumulação de polímero o que revela melhores resultados é o SBR 3, com valores de 5,62% contra 2,34% do SBR 1.

## ii. Alimentação de acidificado de soro de leite (efeito do rácio C:N:P)

Passando agora para a alimentação de soro de leite, neste caso SBR 2 e SBR 4, procedeu-se ao mesmo tipo de análise feita anteriormente para a alimentação de acidificado de FORSU.

Os gráficos seguintes demonstram os resultados de remoção de CQO referente aos SBR 2 e SBR 4.

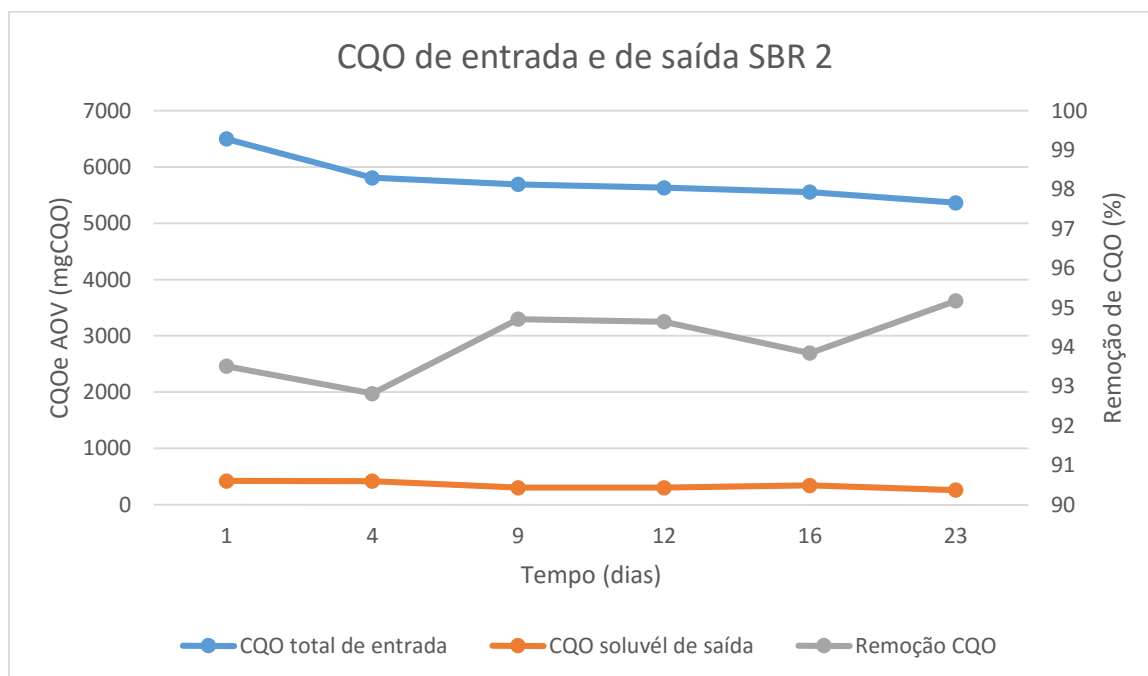


Figura 16 - Carência Química de Oxigénio SBR 2

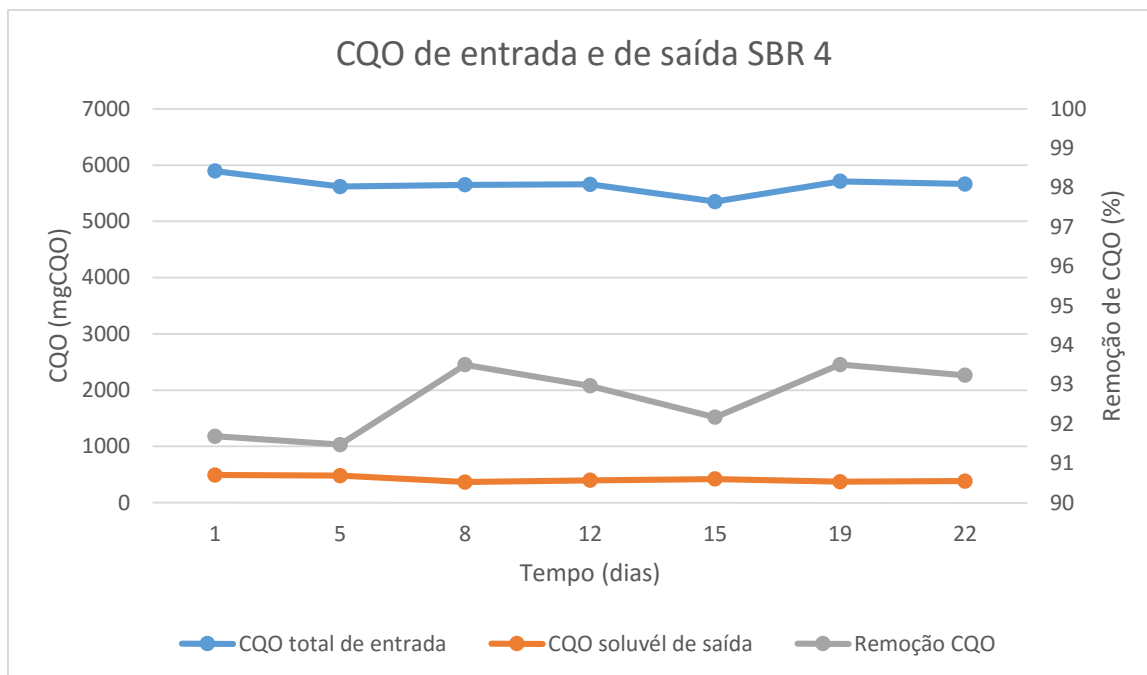


Figura 17 - Carência Química de Oxigênio SBR 4

Pela análise dos gráficos anteriores é possível constatar que apresentam resultados consideráveis relativamente à remoção de CQO, sendo que o SBR 2 apresenta níveis de remoção superiores, embora que não sejam muito discrepantes relativamente aos registados no SBR 4. No geral, ambos os SBR apresentam uma boa performance.

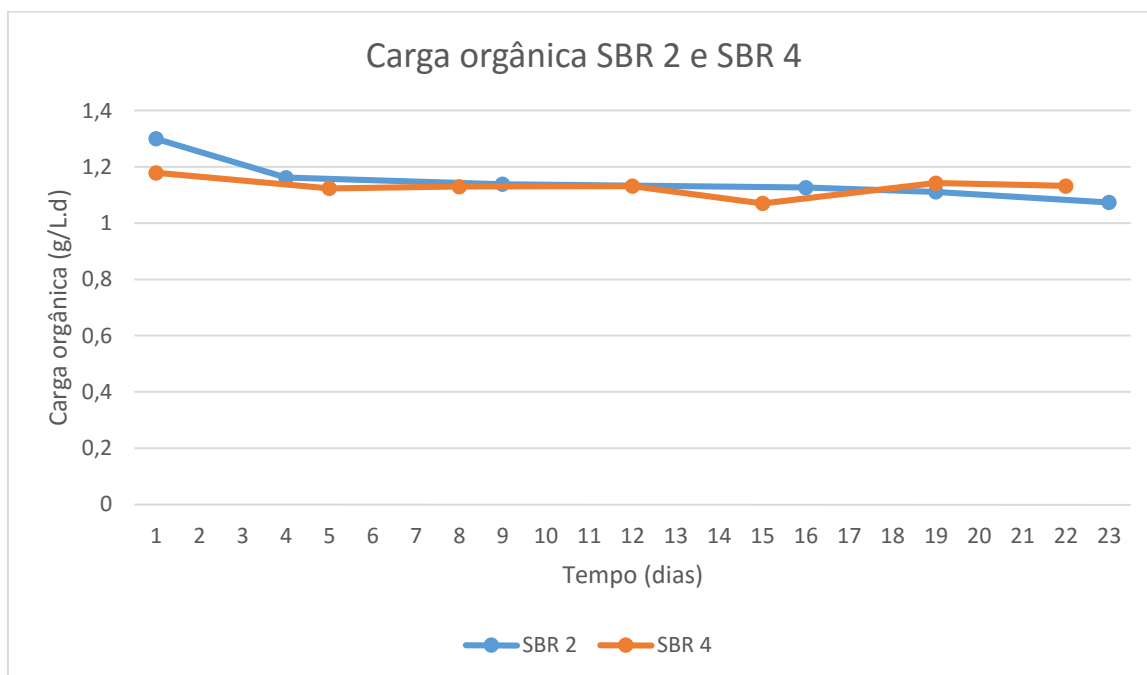


Figura 18 - Carga orgânica SBR 2 e SBR 4

A figura anterior apresenta as cargas orgânicas aplicadas ao longo do período de seleção para cada reator, não havendo variações significativas e tendo sido aplicada uma carga aproximada ao que era previsto. As figuras seguintes referem-se à quantidade de sólidos presentes nos reatores SBR 2 e SBR 4, respetivamente.

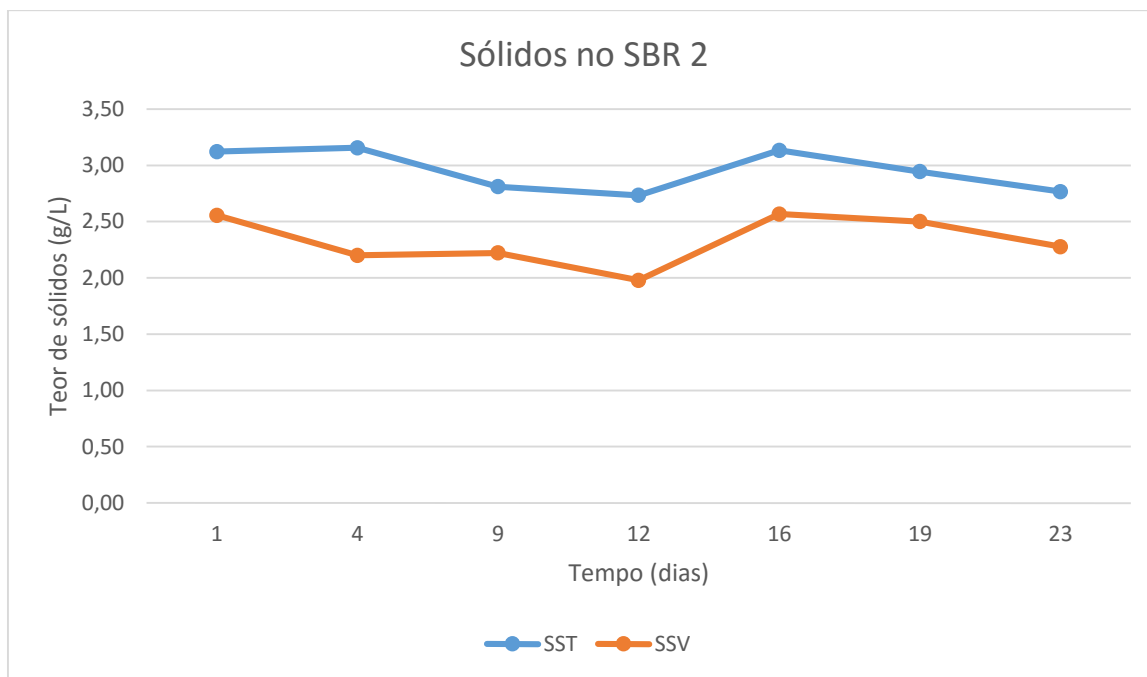


Figura 19 - Teor de biomassa SBR 2

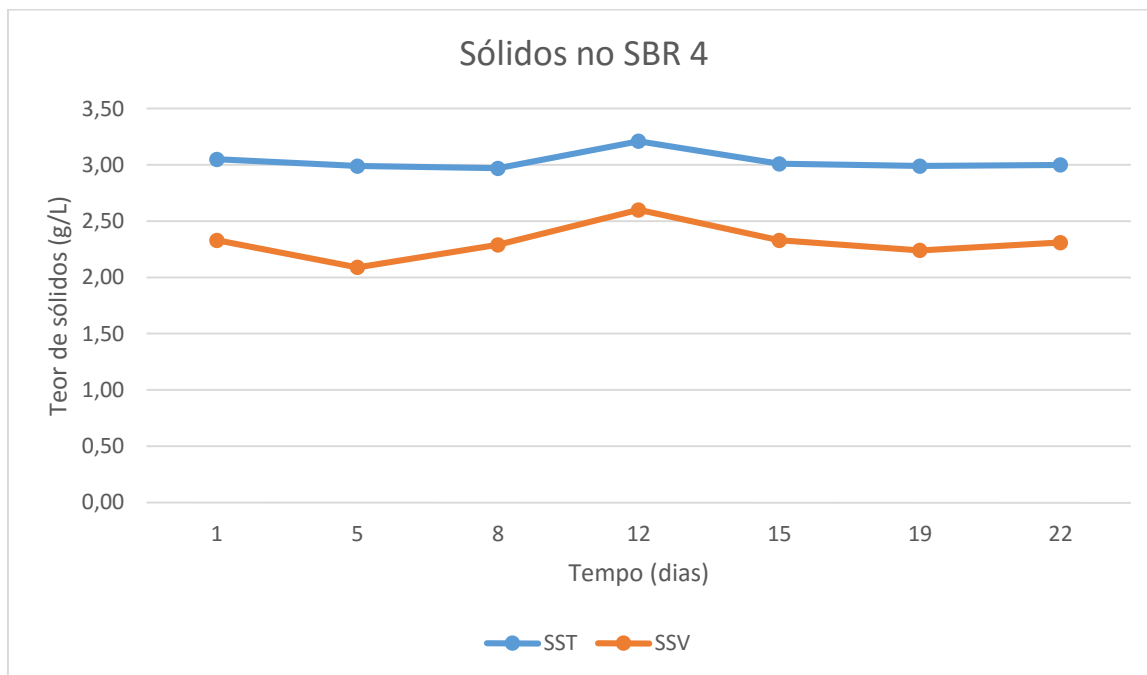


Figura 20 - Teor de biomassa SBR 4

Através da análise dos gráficos é possível ver que em ambos os reatores a concentração de biomassa não apresentou grandes variações, encontrando-se em valores um pouco superiores ao estipulados. Este parâmetro serve para controlar se está a haver crescimento microbológico, querendo se manter dentro dos valores previstos.

Estes dois reatores SBR apresentam valores muito semelhantes ao longo da fase de seleção, embora o SBR 2 apresente valores máximos de remoção de CQO e de acumulação de PHA superiores aos verificados no SBR 4.

iii. *Rácio C:N:P de 100:7:1 (efeito do tipo de alimentação)*

Nesta fase procura-se saber se o tipo de alimentação pode influenciar a remoção de CQO. Para tal será feita a análise em conjunto do comportamento dos SBR 1 e SBR 2, apresentando o mesmo rácio de C:N:P mas variando o tipo de substrato fornecido na alimentação.

A figura 21 apresenta os resultados de remoção de CQO para estes dois reatores.

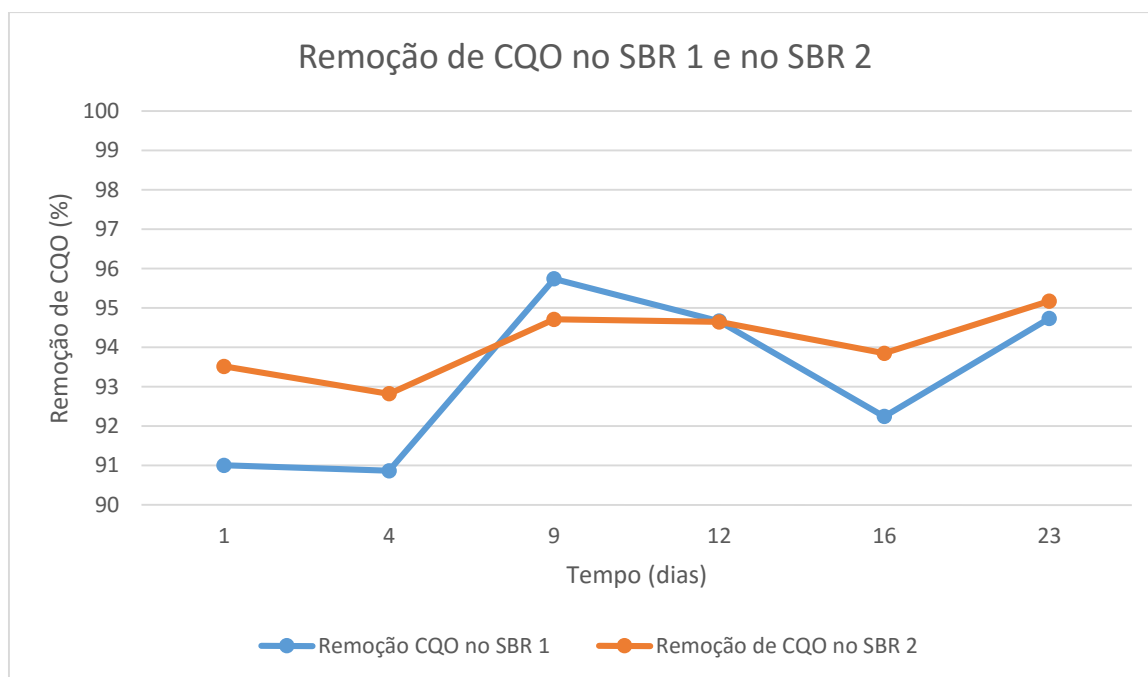


Figura 21 - Comparação de remoção de CQO no SBR 1 e no SBR 2

Analisando os resultados obtidos para o SBR 1 e SBR 2 relativamente remoção de CQO, não se encontram diferenças significativas, pois ambos os reatores apresentam níveis de remoção

muito idênticos, embora em termos médios o SBR 1 apresente valores de remoção de CQO ligeiramente inferiores. Desta forma podemos afirmar que, para este rácio C:N:P, o tipo de substrato não influencia os níveis de remoção e á medida que o período de seleção aumenta a tendência é para os níveis de remoção irem subindo, visto que a biomassa vai selecionando as culturas melhor adaptadas para a alimentação fornecida.

Na figura seguinte estão ilustradas as cargas orgânicas aplicadas a cada um dos reatores ao longo do período de seleção.

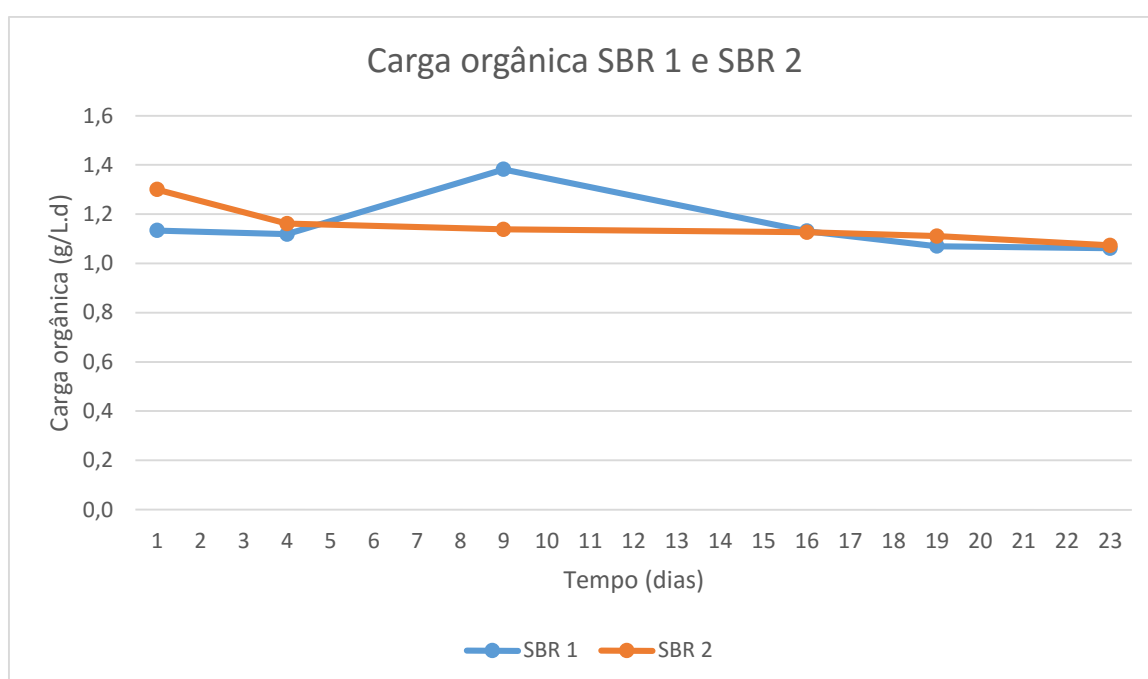


Figura 22 - Carga orgânica SBR 2 e SBR 4

O gráfico anterior serve para verificar se a carga aplicada ao longo do tempo se mantém constante para os dois reatores e, mais importante, se se encontra dentro dos valores propostos ( $1 \text{ g}_{\text{CQO}}/\text{L.d}$ ). É possível verificar que a carga encontra-se um pouco acima do previsto pois para todas as cargas aplicadas tentou-se acertar a partir do CQO dos AOV, ou seja a diferença entre estas cargas pontuais e o CQO dos AOV dá a carência química de oxigénio associada ao efluente, pois o efluente sem AOV também apresenta valores de CQO.

De seguida será feita uma análise à concentração de biomassa nos SBR 1 e SBR 2 de modo a monitorizar o crescimento microbiológicos no interior dos reatores. As figuras seguintes ilustram a evolução ao longo do período de seleção.

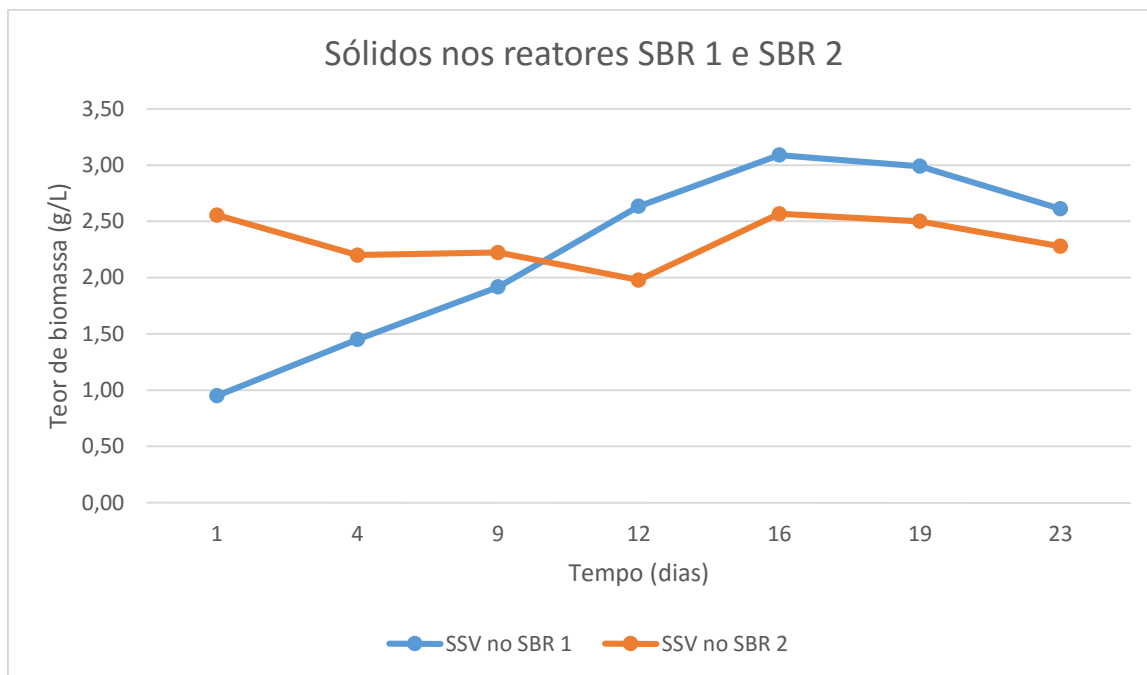


Figura 23 - Teor de sólidos no SBR 1 e no SBR 2

Como referenciado anteriormente, este parâmetro serve apenas para o controlo do crescimento das culturas, para garantir que se mantem dentro dos valores previstos, não apresentados dados para comparação para deduzir qual o melhor substrato a utilizar. A grande variação verificada no SBR 1 deve-se a um valor inicial de sólidos abaixo do previsto e a posterior adição de biomassa ao reator em questão.

Comparando os reatores, o SBR 1 apresenta valores máximos de remoção superiores, enquanto que o SBR 2 apresenta uma acumulação de polímero maior, nada se podendo concluir acerca do melhor tipo de alimentação para este rácio.

#### iv. *Rácio C:N:P de 100:5:1 (efeito do tipo de alimentação)*

Fazendo variar o rácio C:N:P, o SBR 3 e SBR 4 surge em resposta ao que a literatura considera ser as condições ótimas para este tipo de tratamento, isto é, a menos quantidade de nutrientes para limitar o crescimento, neste caso o azoto. Todas as análises foram realizadas da mesma forma aos reatores anteriores, cargas orgânicas equivalentes, apenas as concentrações de nutrientes variam. Estes reatores foram operados durante um período de 22 dias.

Na figura seguinte será ilustrado os resultados referentes à remoção de CQO para os reatores SBR 3 e SBR 4.



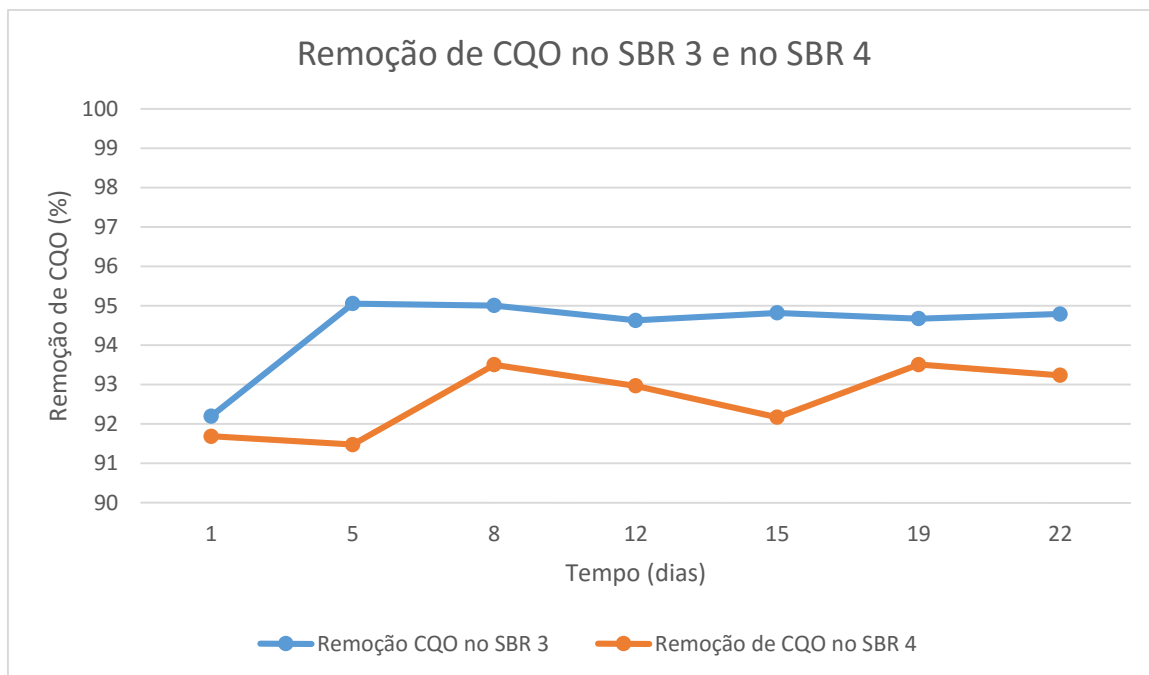


Figura 24 - Comparação de remoção de CQO no SBR 3 e no SBR 4

Após análise dos resultados para os dois reatores é possível constatar que o SBR 3 apresenta valores de remoção de CQO superiores relativamente ao SBR 4, embora não haja uma grande diferença, ainda assim os resultados são conclusivos. Para este rácio de C:N:P, o SBR a que foi fornecida uma alimentação de acidificado de FORSU obtém valores de remoção de CQO maiores em comparação com os obtidos no SBR alimentado com acidificado de soro de leite.

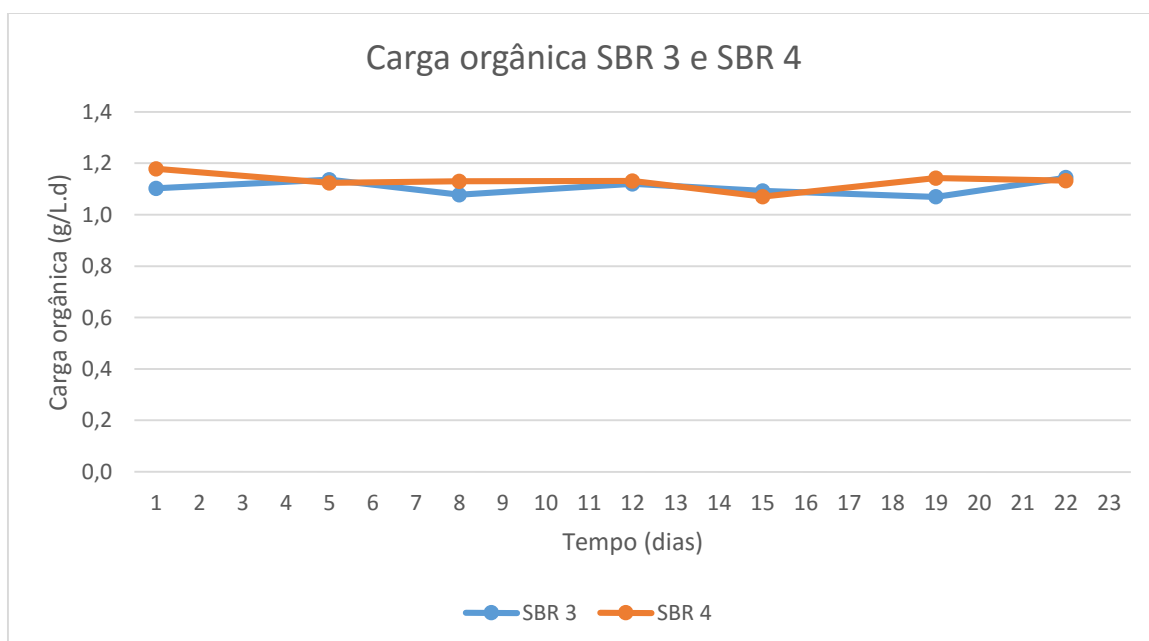


Figura 25 - Carga orgânica SBR 3 e SBR 4

As cargas orgânicas a que SBR 3 e SBR 4 foram sujeitos não apresentam grandes variações, revelando-se crucial para que as condições não sofram variações ao longo do processo de seleção.

Por fim, é feita uma análise das culturas mistas, nomeadamente a nível de crescimento microbiológico. Os resultados são apresentados nos seguintes gráficos, correspondendo a SBR 3 e SBR 4, respetivamente.

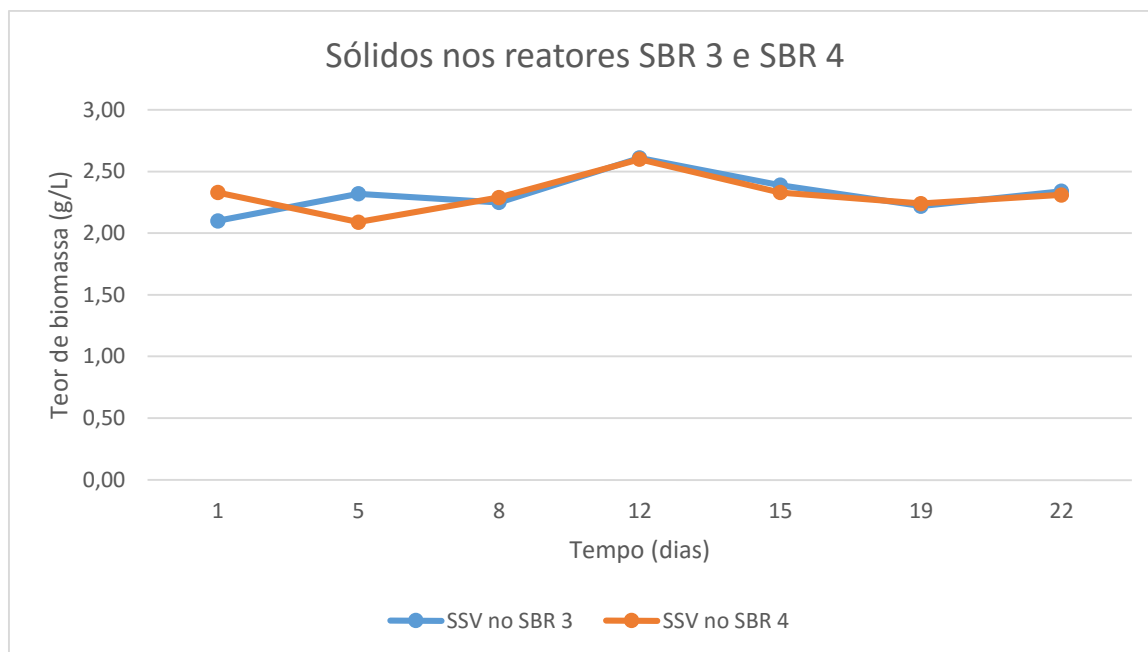


Figura 26 - Teor de sólidos no SBR 3 e no SBR 4

As variações ao nível do teor de sólidos não são significativas, sendo que os valores encontram-se um pouco acima do previsto entre 2 (valor estipulado) e 2,5 g/L. Embora os valores se encontrem acima por terem concentrações parecidas o processo não é comprometido.

Desta forma, podemos afirmar que, para um rácio C:N:P de 100:5:1, o reator alimentado com FORSU acidificada (SBR 3) apresenta valores mais elevados, tanto nos valores de remoção de CQO como na acumulação de polímero.

#### v. *Resumo de resultados da fase de seleção*

Após análise dos resultados referentes à fase de seleção, procura-se saber a que tipo de alimentação e de rácio C:N:P os valores de remoção de CQO são maximizados. A tabela seguinte resume as condições a que cada SBR foi sujeito bem como os valores máximos de remoção de CQO registados.

Tabela 14 - Tabela resumo da operação dos quatro SBR

Reator	Alimentação	Rácio C:N:P	Intervalo de Remoção CQO (%)	% PHA no final (mPHA/mSSV)
<b>SBR 1</b>	Acidificado de FORSU	100:7:1	90,87 - 95,74	2,34
<b>SBR 2</b>	Acidificado de soro de leite		92,82 - 95,17	2,85
<b>SBR 3</b>	Acidificado de FORSU	100:5:1	92,20 - 95,05	5,62
<b>SBR 4</b>	Acidificado de soro de leite		91,47 - 93,50	2,32

É possível verificar que quando o rácio C:N:P é de 100:7:1, os valores de remoção são superiores relativamente ao rácio de 100:5:1. Outra conclusão que se pode retirar após análise é que os SBR a que foi fornecido acidificado de FORSU como substrato apresentam valores de remoção superiores aos de acidificado de soro de leite, para rácios C:N:P iguais. Juntando estas duas condições encontramos o reator que apresentou melhores de remoção de CQO: o SBR 1 (cerca de 95,74%). No global, os quatro SBR apresentaram comportamentos semelhantes, apesar das condições, com eficiências de remoção elevadas. Em termos de acumulação de polímero, o que se destaca é o reator SBR 3 com uma acumulação de PHA no final da fase de seleção de 5,62%, valor duas vezes superior aos restantes. Embora a limitação de azoto possa ser a razão para este valor de acumulação tão elevado, o mesmo não se verifica para o reator nas mesmas condições com alimentação de soro de leite (SBR 4)

#### vi. *Evolução da acumulação de PHA nos SBR*

Ao longo deste processo de seleção também foi analisado a acumulação de PHA, embora nesta fase não seja o mais relevante. Esta fase foca-se principalmente na seleção das culturas, mas se os níveis de acumulação de PHA já forem elevados poderão proporcionar uma maior acumulação na fase seguinte (ensaios em reatores descontínuos). A figura seguinte ilustra os valores de acumulação ao longo da fase de seleção. Esta evolução foi estudada para os reatores SBR 1 e SBR 2.

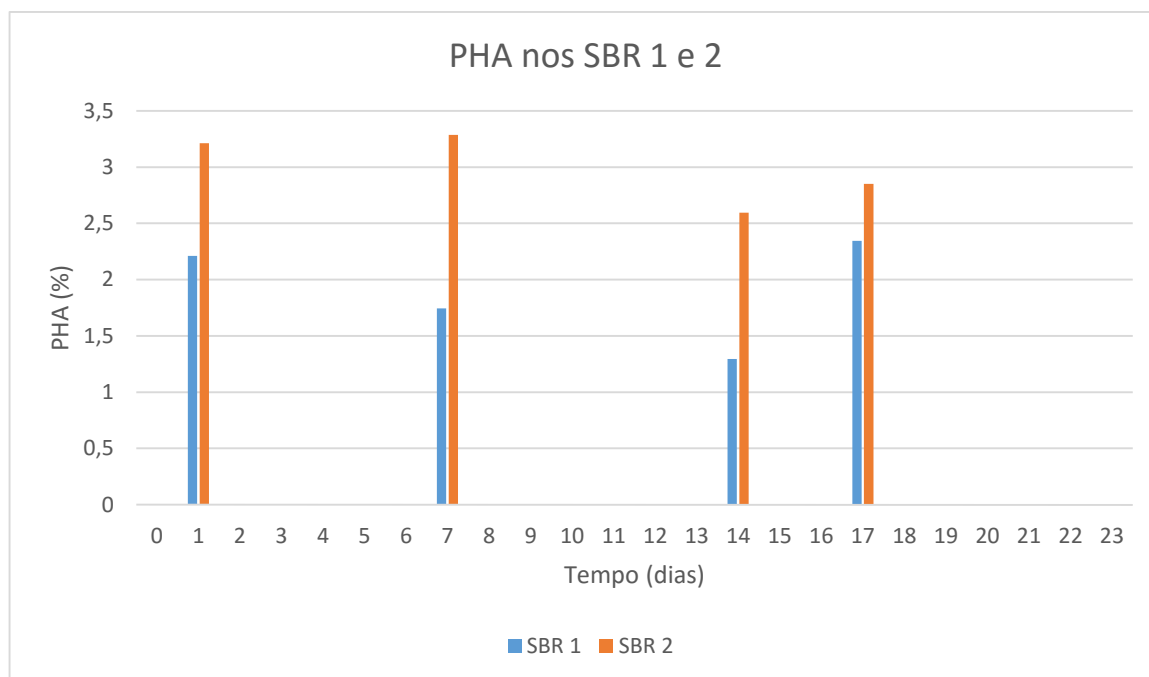


Figura 27 - PHA nos SBR

Os valores registados foram relativamente baixos, mas normais nesta fase pelo que se torne um pouco irrelevante nesta fase os níveis de acumulação pois o objetivo principal desta fase era a seleção para os ensaios de acumulação em reatores descontínuos. No SBR 1 a acumulação verificada nesta fase variou entre 1,29 e 2,34 %, enquanto para o SBR 2 os valores variaram de 2,59 a 3,29 %, sendo o SBR 2 a apresentar melhores resultados neste parâmetro. Em ambos os casos verificamos que há a presença de culturas produtoras de PHA.

#### 4.2. Fase de acumulação em reatores descontínuos

Terminada a fase de seleção das culturas mistas nos reatores SBR, passou-se à fase de acumulação recorrendo a reatores descontínuos. Anteriormente, na Tabela 8, foi especificado as condições de cada um dos 11 reatores descontínuos a serem realizados. Nos primeiros três *batch* (B0, B1 e B2) foi testada a influencia do pH da alimentação no processo de acumulação de PHA. Ao mesmo tempo foi também testado se seria viável submeter uma cultura selecionada para um dado substrato, o acidificado de soro de leite, a outro tipo de alimentação, acidificado de FORSU, como realizado para B0. Neste caso os resultados foram pouco significativos, pois a remoção de CQO no final do processo foi insignificante (cerca de 10%). As culturas mistas que tinham sido selecionadas no SBR 2 praticamente não consumiram os AOV presentes na alimentação, tendo até ocorrido uma redução no polímero. Desta forma pode-se concluir que alimentar um substrato

diferente daquele para o qual a cultura tinha sido selecionada, não produz qualquer tipo de resultados relevantes para o propósito deste trabalho. Os *batch* B1 e B2 possuem inoculo proveniente do SBR 1, sendo que a alimentação (acidificado de FORSU) foi acertada para valores de pH de 5 e 10, respetivamente. Finalizando o estudo desta condição, os *batch* B3 e B4 também são submetidos a pH de 5 e 10, respetivamente, mas utilizando como base de alimentação acidificado de soro de leite e o inoculo provem do reator SBR 2. De seguida foi testado o efeito da carga orgânica na acumulação do polímero. Os *batch* B5 e B6 possuem culturas retiradas do reator SBR 1, sendo o primeiro submetido a uma carga de 2 g/L.d e o segundo a uma carga de 3 g/L.d. O mesmo foi realizado para culturas provenientes do SBR 2, neste caso nos *batch* B7 e B8, aplicando cargas orgânicas de 2 g/L.d e 3 g/L.d, respetivamente. Na parte final, foi realizada uma nova seleção de culturas em reatores sequenciais (SBR 3 e SBR 4) alterando as condições de C:N:P através da redução do nível de amónia segundo o que a literatura recomenda como o indicado para este tipo de culturas (Ammary, 2004). Após o período de seleção o inoculo foi introduzido no *batch* B9 (culturas mistas selecionadas no reator SBR 3) e B10 (culturas mistas selecionadas no reator SBR 4), sendo aplicada uma carga orgânica de 2 g/L.d nos dois reatores descontínuos.

Os ensaios nos reatores descontínuos serão analisados aos pares, para diferenciar os resultados para uma condição em concreto. Para cada um dos ensaios é analisado o pH, concentração de AOV ao longo do tempo, remoção de CQO solúvel e acumulação de polímero.

#### 4.2.1. Alimentação de acidificado de FORSU

Neste capitulo vai ser focado apenas os *batch* a que lhes foi dado como substrato acidificado de FORSU, aplicando diversas condições (pH, carga orgânica e rácio C:N:P) de modo a determinar a sua influencia na acumulação de PHA pelas culturas mistas.

##### *i. Efeito do pH*

Uma das condições que foi testada foi o pH, pretendendo saber se a acumulação é influenciada por este parâmetro, e se sim, se é melhor um aumento ou uma diminuição do mesmo.

As figuras seguintes apresentam o comportamento dos *batch* sujeitos a esta condição.

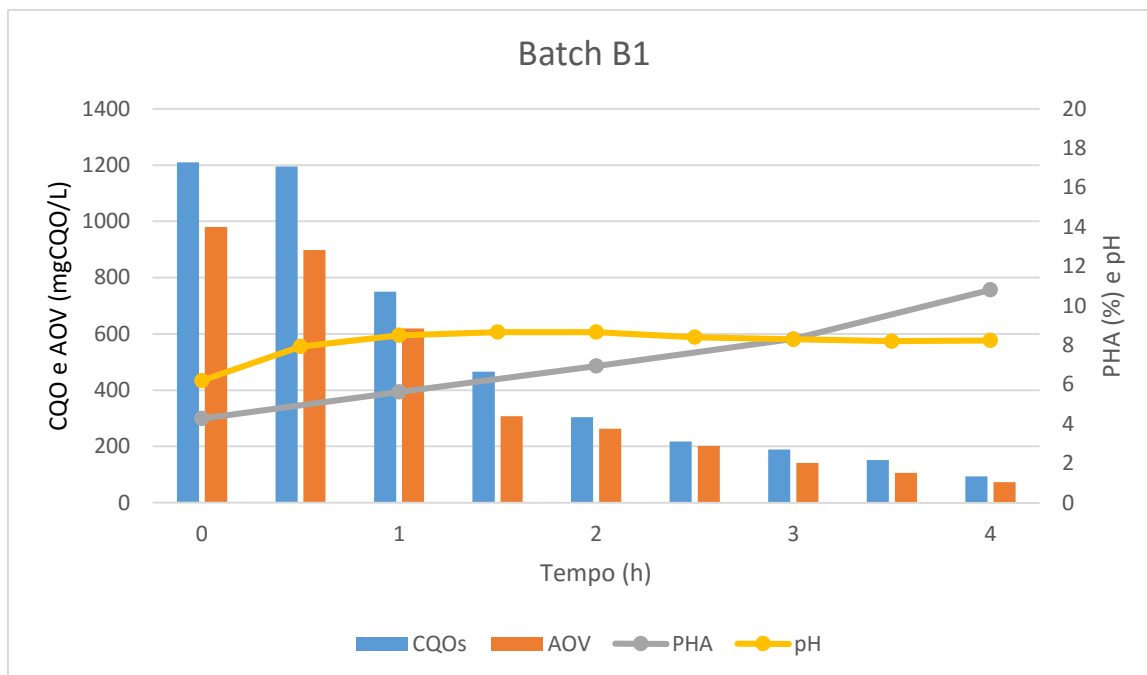


Figura 28 – Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B1 (pH na alimentação de 5)

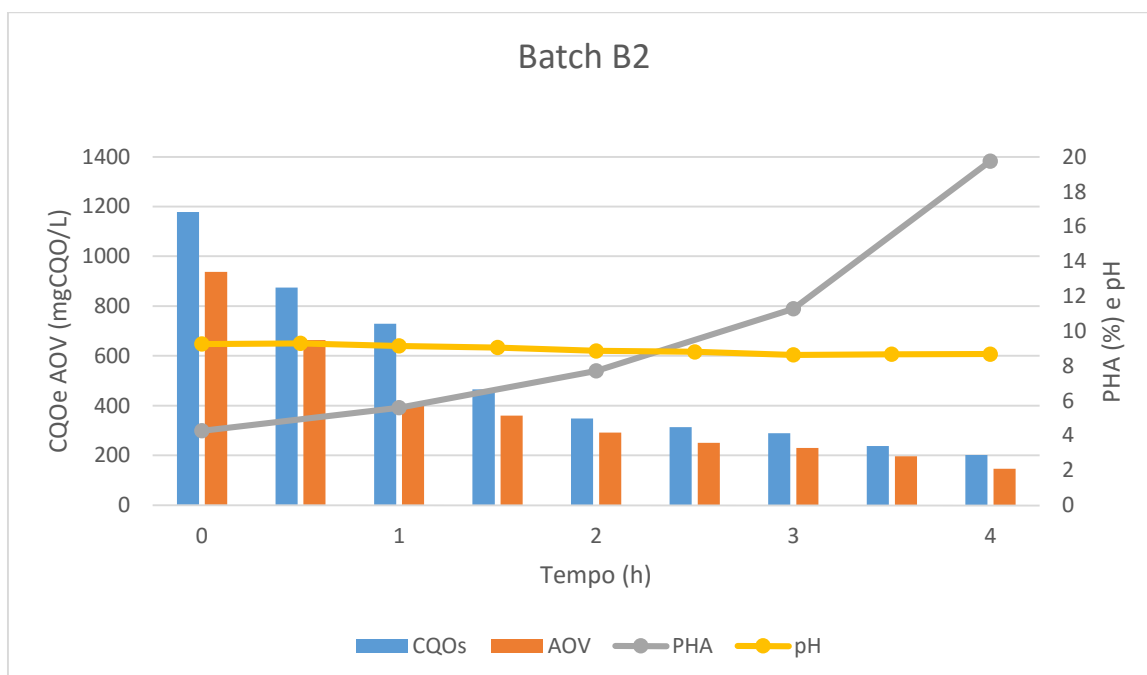


Figura 29 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B2 (pH na alimentação de 10)

Através da análise dos gráficos anteriores, podem ser verificar algumas diferenças com o pH. Nos dois primeiros *batch* foi aplicada uma carga orgânica de 1 g/L.d, com uma concentração de biomassa de 2,61 g/L, sendo que a alimentação de B1 foi ajustada para pH=5 e a alimentação de B2 para pH=10. Os pH registados no tempo 0 são referentes ao momento em que a

alimentação é introduzida no reator descontínuo, daí os valores registados não serem de 5 e 10 para B1 e B2, respetivamente. Começando pela análise do pH, registou-se que ao longo do tempo tendem para valores perto de pH=8, valor ao qual foi controlado na fase de seleção. Relativamente à remoção de CQO e consumo de AOV, estão diretamente relacionadas e regista-se um decréscimo ao longo do tempo ocorrendo uma remoção ao final de 4h de 90% para B1 e 83% para o B2. Apesar de no *batch* B1 haver um consumo de AOV e de CQO maior, é o *batch* B2 que apresenta melhores resultados ao nível da acumulação do PHA. Os valores iniciais de polímero acumulado eram idênticos nos dois *batch*, como era esperado, mas para o mesmo período de tempo, B1 consegue atingir uma acumulação de 10,81% enquanto que B2 atinge quase o dobro deste, chegando a valores de 19,76%. Para o acidificado da FORSU fica claro que pH mais elevado na alimentação condiciona uma maior acumulação do biopolímero.

## ii. Efeito da carga orgânica

O efeito da carga orgânica foi a segunda condição imposta nos ensaios *batch*, procurando uma resposta a esta questão foram testados *batch* com diferentes cargas de modo a saber se esta condição influencia a acumulação de polímero.

Nos gráficos seguintes são apresentados os resultados referentes ao estudo desta condição.

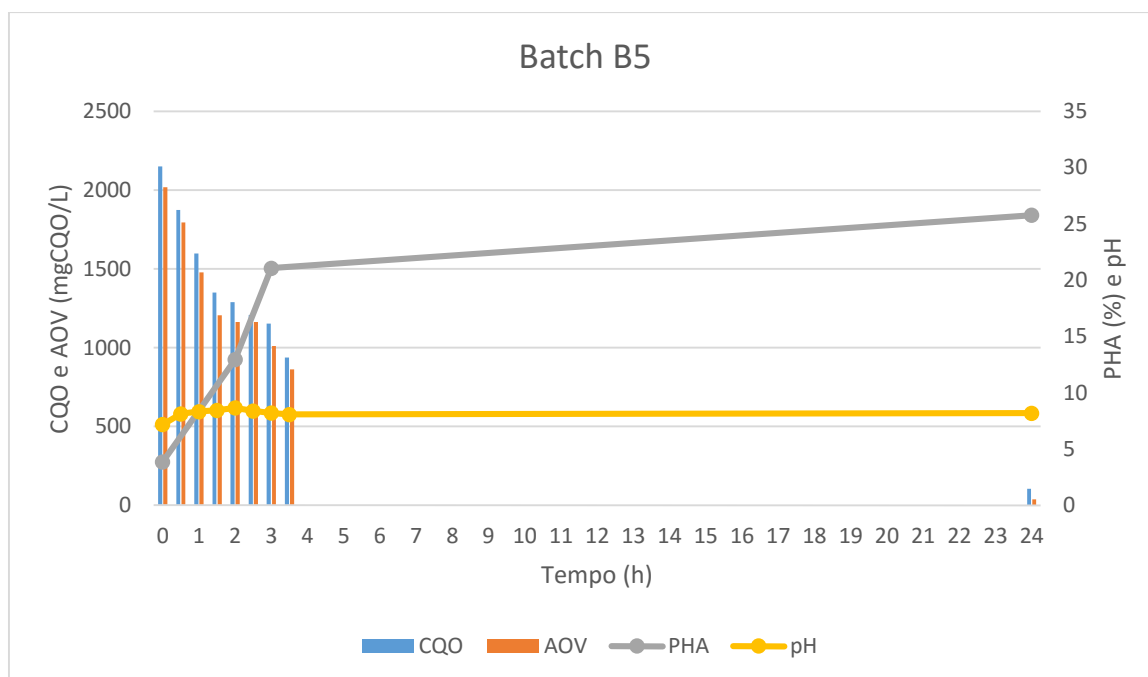


Figura 30 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B5 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d)

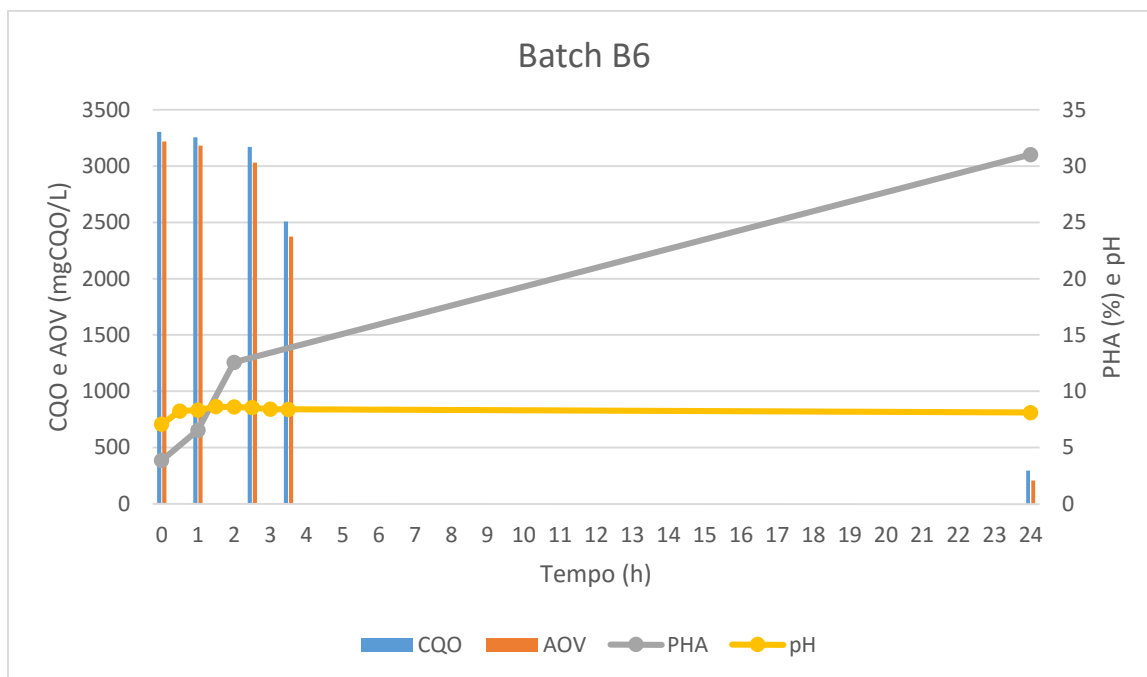


Figura 31 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B6 (carga orgânica de 3 gCQO/L.d)

Nesta fase optou-se por realizar análises mais espaçadas temporalmente, pois como o inoculo dos SBR estava habituado a cargas de 1 g/L.d, as análises feitas de 30 em 30 minutos não apresentavam resultados muito distintos.

Nos *batch* anteriores em que a carga orgânica era semelhante à aplicada nos SBR, ao final de 4 horas os AOV já tinham sido consumidos. Tendo aumentado a carga nestes ensaios para testar o efeito da mesma, a ultima análise foi realizada passadas 24 horas do inicio do ensaio. Desta forma foi possível garantir que os AOV eram consumidos quase na sua totalidade para o processo de acumulação poder ser maximizado. Relativamente aos *batch* é possível verificar que devido às cargas orgânicas aplicadas serem elevadas, no final do mesmo período de tempo em que nos *batch* anteriores os AOV já tinham sido consumidos, nestes ensaios os valores de CQO e AOV continuavam elevados. No entanto ao final de 24 horas os níveis de remoção aproximaram-se dos registados na fase anterior. O pH não oscila muito, sendo que com a presença de uma quantidade de ácidos tão elevada tem tendência a baixar mas pouco tempo depois volta a valores aproximados de pH 8, valor ao qual ocorreu um controlo na fase de seleção. No que toca à acumulação de PHA os resultados provam que à medida que a carga é aumentada, as culturas tendem a acumular consequentemente mais polímero. Quando a carga orgânica é de 2 g<sub>CQO</sub>/L.d



os valores chegam a 25%, enquanto que para a carga de 3 g<sub>CQO</sub>/L.d registam-se valores a rondar 31%. É de frisar que no *batch* B6 ainda se encontravam presentes AOV passados 24 horas, podendo se afirmar que os resultados de acumulação poderiam ser superiores após o consumo destes.

### iii. Efeito do rácio C:N:P

Por ultimo testou-se se o rácio C:N:P aplicado na fase de seleção tem influência na acumulação de PHA.

As figuras abaixo ilustram os resultados obtidos nos ensaios *batch* em que foi testada esta condição.

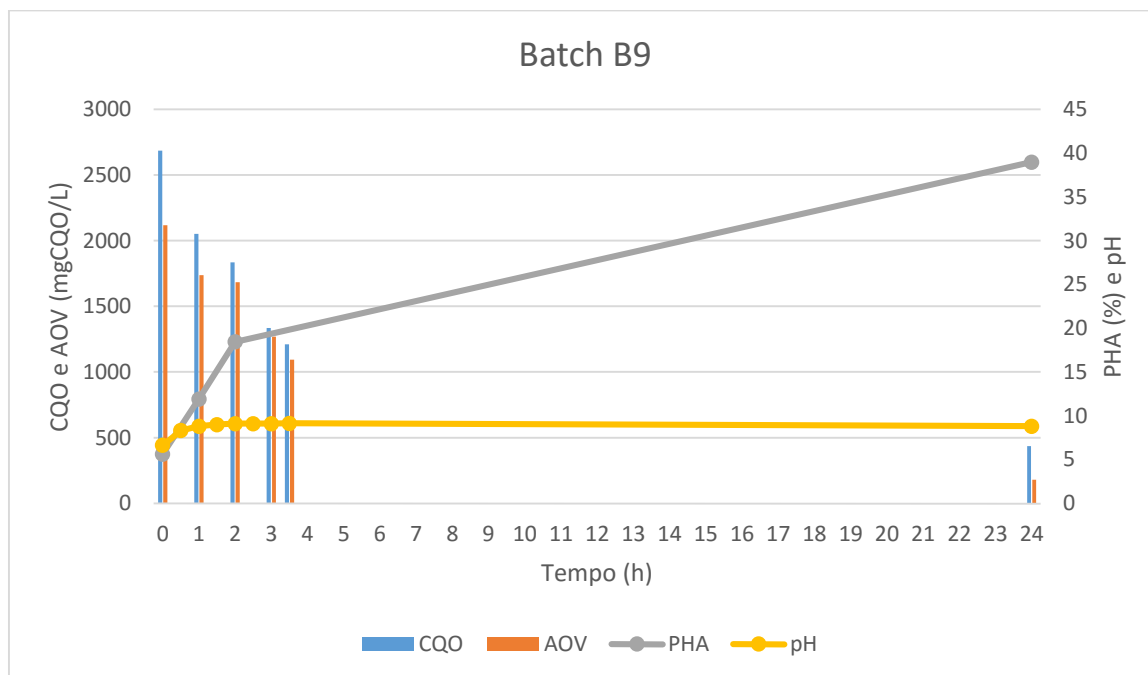


Figura 32 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B9 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d)

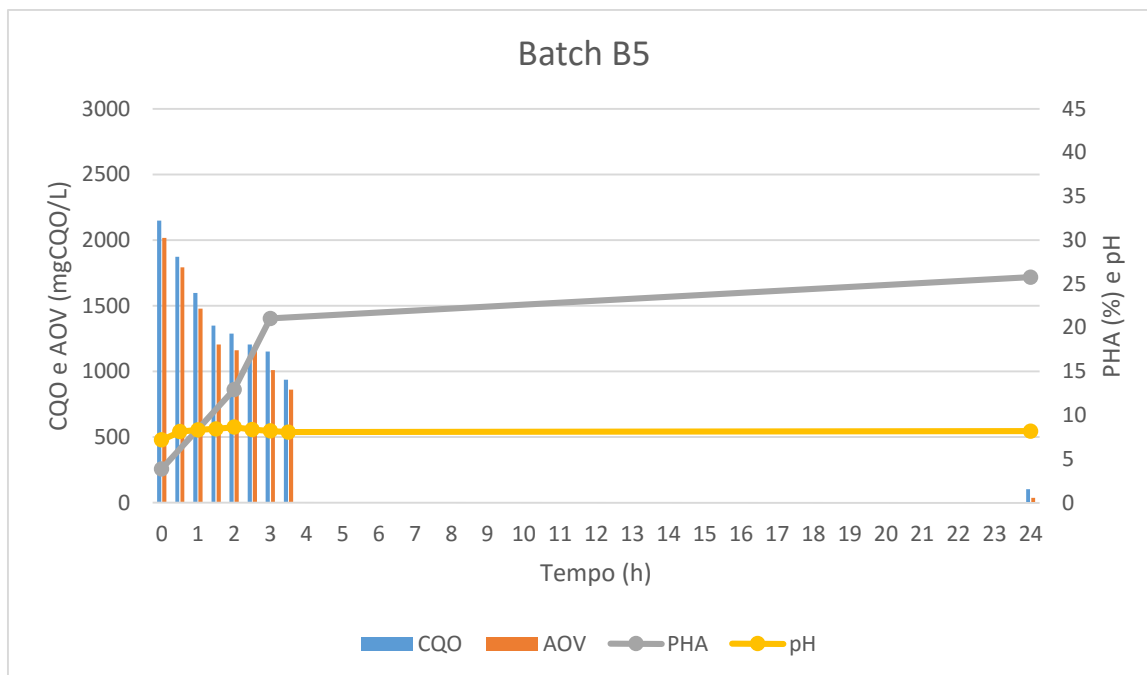


Figura 33 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B5 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d)

Comparando os resultados obtidos entre o *batch* B5 e o *batch* B9, a grande diferença verificada é no valor de acumulação de PHA. Numa análise mais detalhada podemos verificar que apesar de haver um consumo de AOV (e consequente remoção de CQO) mais lenta no *batch* B9, a percentagem de acumulação deste ultimo é relativamente superior comparando com B5. Os perfis de pH mantêm a tendência anterior (pH inicial mais baixo devido à elevada concentração de AOV que tende a estabilizar para valores próximos de pH 8), valores de remoção próximos aos registados na fase de seleção e valores baixos de AOV no meio, embora não sejam residuais como os verificados na fase anterior. Relativamente à acumulação do biopolímero, é de registar que as culturas mistas selecionadas no SBR 3, comparando com as selecionadas no SBR 1, apresentam um acréscimo na percentagem acumulada de cerca de 25% para valores a rondar os 39%, para este novo rácio de C:N:P.

#### 4.2.2. Alimentação de acidificado de soro de leite

##### i. Efeito de pH

Realizando o mesmo procedimento utilizado anteriormente, para os *batch* de acidificado de FORSU, desta vez pretende-se testar se o aumento do pH para este tipo de alimentação produz diferenças relativamente à acumulação de biopolímero.

Os resultados apresentados nas seguintes figuras abaixo, ilustram o efeito do pH para este tipo de alimentação.

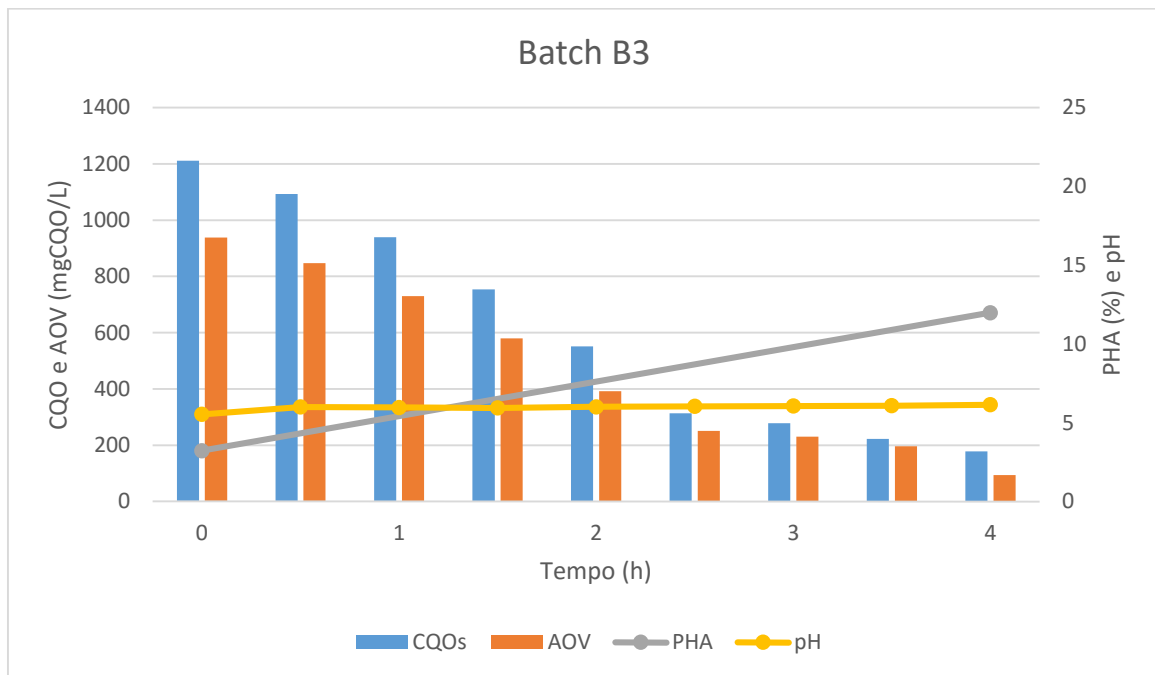


Figura 34 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B3 (pH na alimentação de 5)

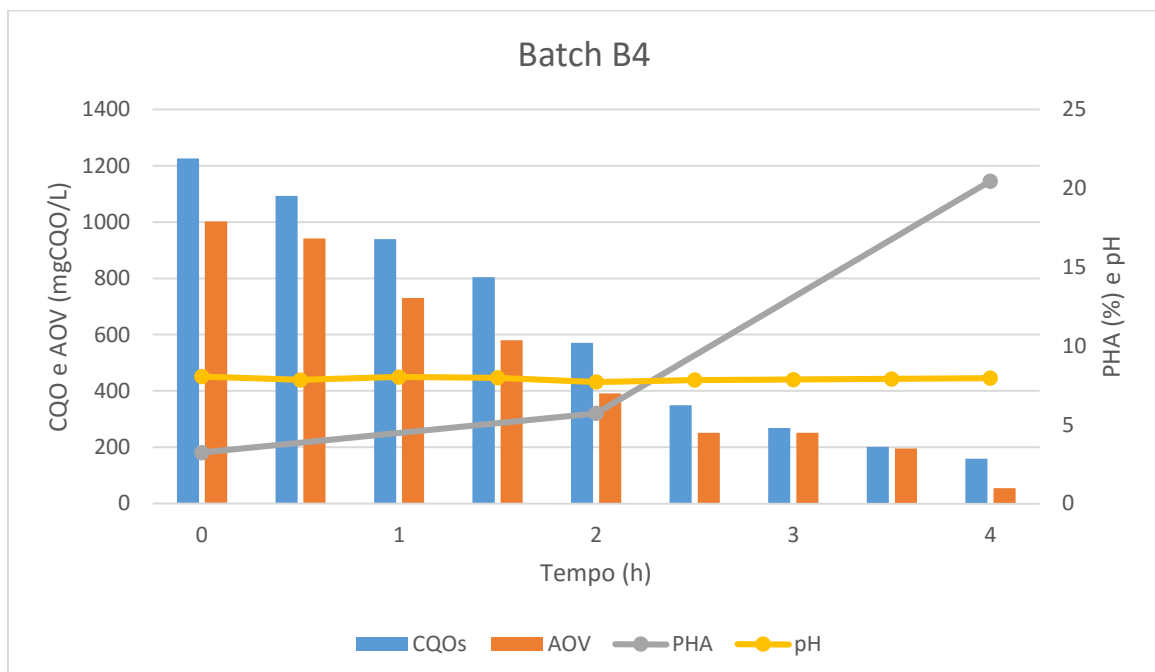


Figura 35 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B4 (pH na alimentação de 10)

A variação do pH também influencia os resultados referentes à acumulação do polímero no inóculo do SBR 2. Relativamente à variância de pH não existem grandes variâncias ao longo do

tempo, sendo que no *batch* B3 tem tendência a aumentar gradualmente ao longo do tempo até estabilizar e no *batch* B4 ocorre uma ligeira diminuição, fixando do dentro de uma gama de valores durante o processo (pH aproximadamente 6). Os consumos de AOV e remoção de CQO são idênticos aos registados à fase de seleção, sendo que ainda existe um teor de AOV residual ao final de 4 horas. Quanto maior for a carga orgânica aplicada maior será o período de consumo, pois durante o ciclo ao final de 1,5 h o substrato era completamente assimilado, enquanto que se a quantidade dobrar verificamos que demora sensivelmente 4 horas para que ocorra o mesmo.

Relativamente à acumulação de PHA, embora haja falta de pontos intermédios é possível verificar que pH mais altos resultam numa melhor acumulação. Ambos apresentam valores iniciais muito semelhantes, pois proveem ambos do mesmo reator no mesmo estado, mas no final os valores são bastante distintos. Relativamente ao *batch* B1 a acumulação quase que quadruplica ao final das 4 horas, chegando aproximadamente a 12%, enquanto que no *batch* B4 os valores são ainda maiores chegando a 20,46%.

## ii. Efeito da carga orgânica

Recorrendo ao inóculo selecionado no SBR 2, pretende-se agora testar o efeito da carga orgânica na acumulação de PHA pelas culturas mistas.

As figuras seguintes ilustram os resultados obtidos nesta fase.

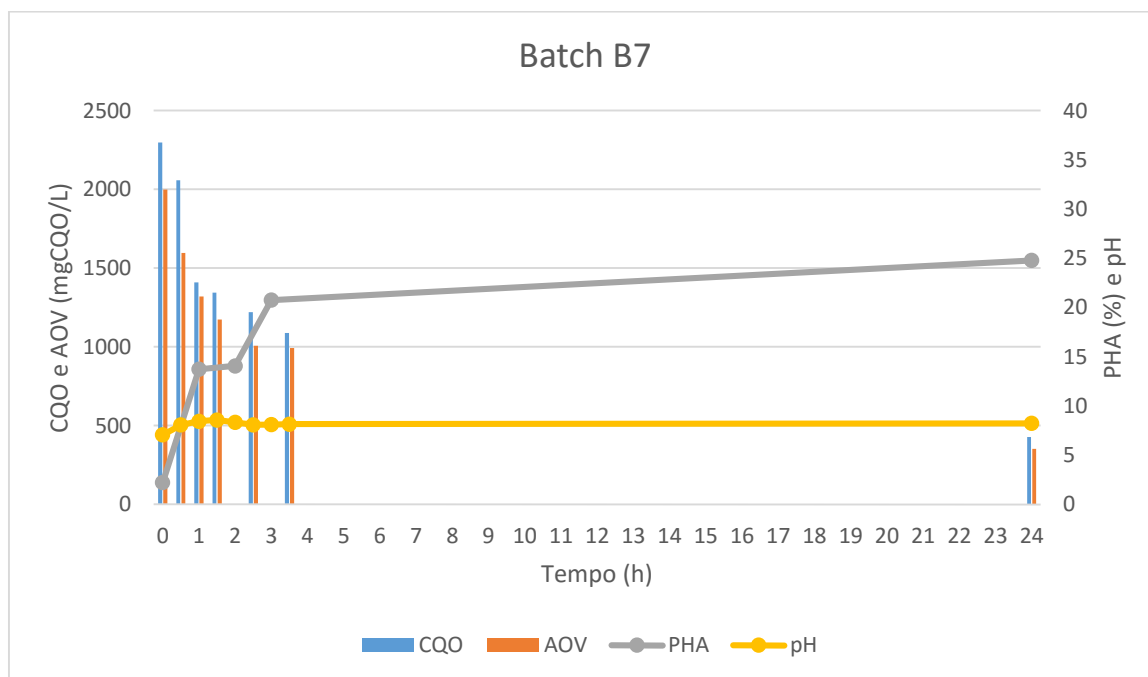


Figura 36 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B7 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d)

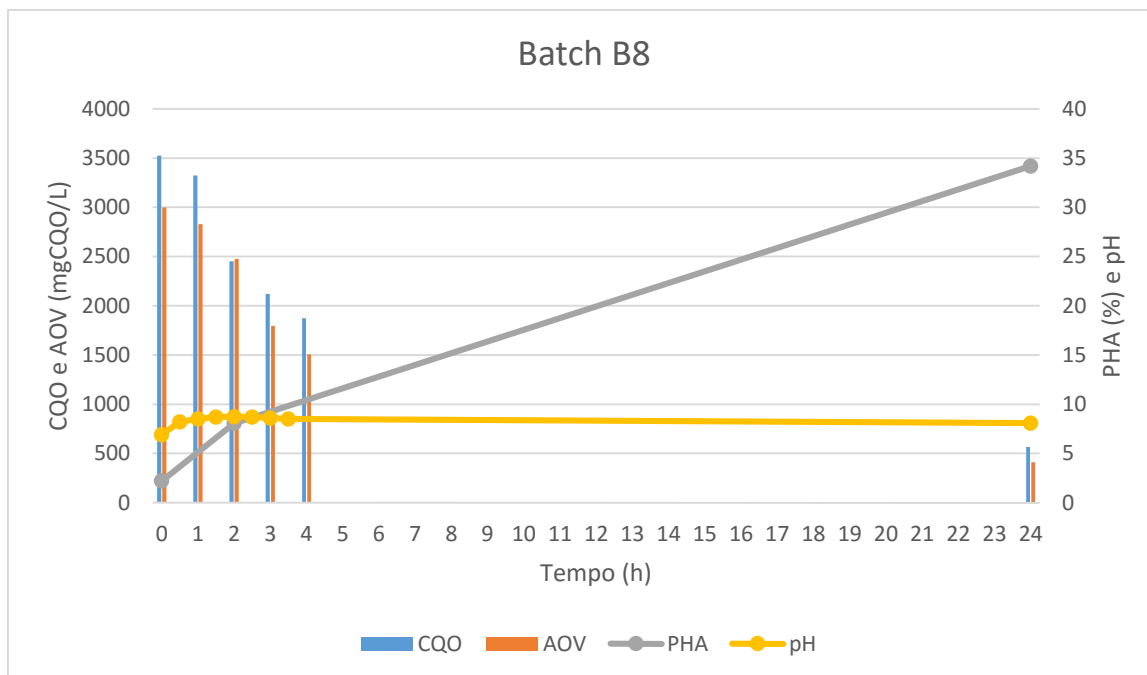


Figura 37 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B8 (carga orgânica de 3 gCQO/L.d)

Nas figuras acima estão os resultados referentes aos *batch* B7 e B8. Vê-se com clareza uma semelhança aos *batch* anteriores (B5 e B6) na medida em que quanto maior for a carga orgânica aplicada, maior acumulação de polímero é registrado. Os valores de pH iniciais são idênticos e pouco variam ao longo do processo, nos dois testes, estabilizando em valores próximos de 8. Relativamente a remoção de CQO e consumo de AOV podemos tirar as mesmas conclusões que para os *batch* B5 e B6: com o aumento significativo da carga, o consumo de AOV e remoção de CQO decorrem num período de tempo maior, o que é normal visto que havendo o dobro ou o triplo de alimentação para concentrações de biomassa semelhantes é lógico que o seu consumo se estenda. Mesmo ao final de 24 horas ainda existem AOV presentes no meio, o que pode ser explicado pelo facto de que na fase de seleção os ciclos serem de 12 horas em que a alimentação apresentava concentrações CQO de 0,5 g/L. Na presença de alimentações com quatro ou seis vezes superior o seu consumo torna-se mais prolongado chegando a ultrapassar as 24 horas.

Relativamente ao objetivo principal deste estudo (acumulação do biopolímero) os resultados são consideráveis, atingindo aproximadamente 25% quando a carga aplicada é de 2 g/L.d e ultrapassando os 34% quando elevamos a carga orgânica para 3 g/L.d.

Segundo estes resultados podemos afirmar que o processo de acumulação beneficia com o aumento da carga aplicada conseguindo valores, em um dos casos 16 vezes superior ao inicial.

Para maximização do processo o consumo de AOV deve ser completo desta forma podendo se obter valores de PHA ainda superiores.

iii. *Efeito do rácio C:N:P*

Do mesmo modo que para a alimentação de acidificado de FORSU, o efeito do rácio C:N:P também foi testado para a alimentação de acidificado de soro de leite, procurando saber se este parâmetro tem uma influencia na acumulação de PHA pelas culturas mistas.

As figuras seguintes ilustram os resultados obtidos fazendo variar esta condição.

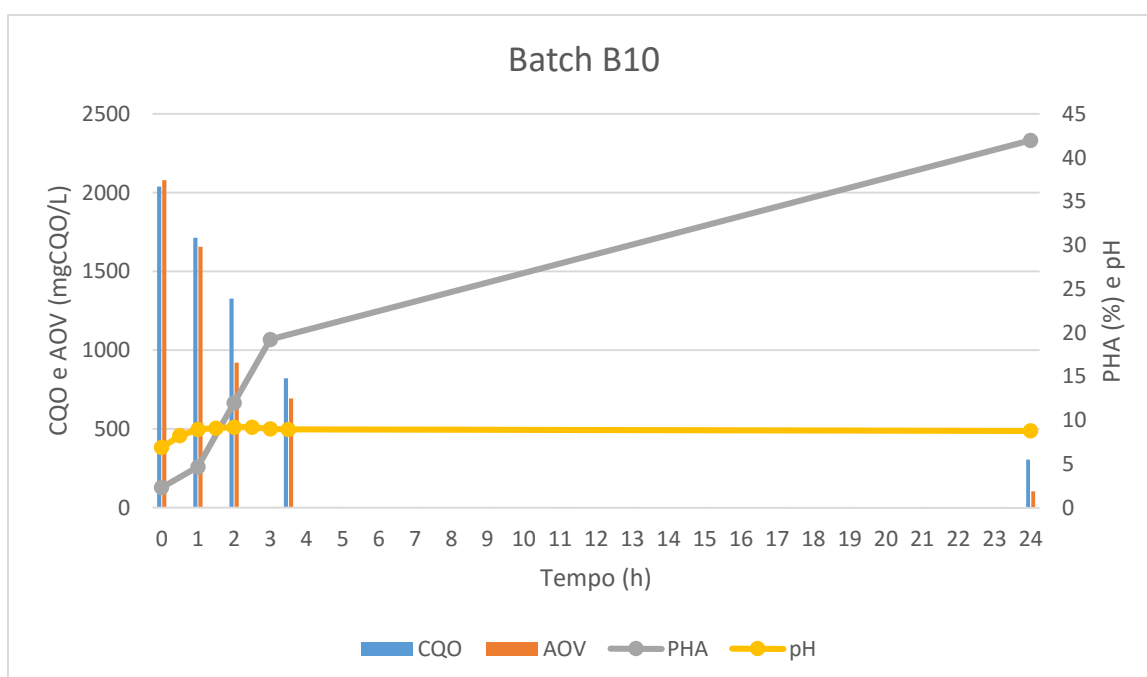


Figura 38 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B10 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d)

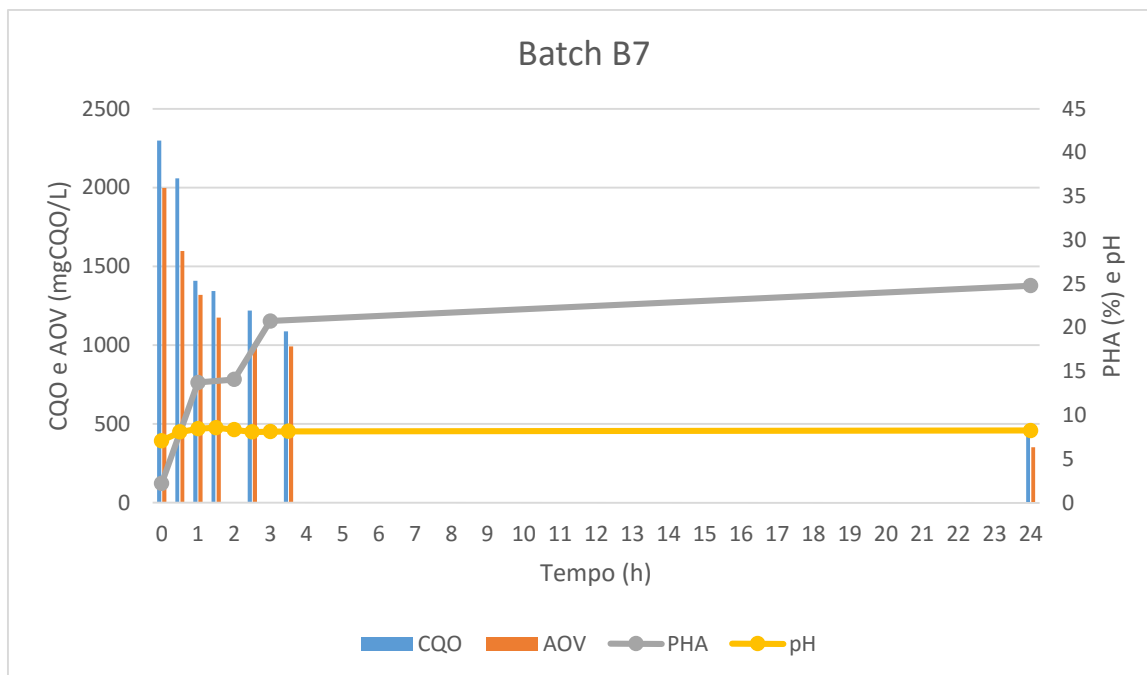


Figura 39 - Evolução do CQO solúvel, AOV, pH e PHA para o batch B7 (carga orgânica de 2 gCQO/L.d)

Após uma análise dos resultados obtidos é possível verificar que existe uma ligeira variação do pH ao longo do processo, níveis de consumo de AOV e remoção de CQO parecidos, embora que para a mesma carga e para o mesmo período de tempo, o inóculo do *batch* B10 é mais eficiente e em termos de produção/acumulação de PHA pelas culturas, comparando o inóculo proveniente do SBR 2 com o do SBR 4, existe um acréscimo de 24,8% para 42%, valor significativo quando se varia o rácio de C:N:P de 100:7:1 para 100:5:1.

#### 4.2.3. Discussão de resultados dos ensaios de reatores descontínuos

De modo a resumir os resultados desta fase, foi elaborada a tabela 15 com os dados de remoção de CQO, consumo de AOV e valores de acumulação de PHA pelas culturas mistas.

Tabela 15 - Tabela resumo da fase de acumulação de PHA em ensaios batch

Alimentação	Batch	Condição			Remoção CQO (%)	Consumo de AOV (%)	% PHA (mPHA/mSSV)
		pH na alimentação	Carga orgânica (g <sub>CQO</sub> /L.d)	Rácio C:N:P			
Acidificado de FORSU	B1	5	1	100:7:1	92,31	92,65	10,81
	B2	10			82,94	84,53	19,76
	B5	Sem ajuste	2		95,21	97,87	25,76
	B6		3		91,10	93,63	31,04
	B9		2	100:5:1	83,76	91,60	38,97
Acidificado de soro de leite	B3	5	1	100:7:1	85,30	89,97	11,97
	B4	10			87,03	94,61	20,46
	B7	Sem ajuste	2		81,40	82,39	24,78
	B8		3		88,42	86,38	34,19
	B10		2	100:5:1	85,06	94,96	41,97

Ao longo desta fase foram testadas diversas condições, procurando encontrar as que maximizavam o processo de acumulação de PHA pelas culturas. Foi estudado o efeito de vários parâmetros: pH, carga orgânica e rácio C:N:P. Relativamente ao primeiro constata-se que para valores de pH mais elevados, neste caso pH 10, os níveis de acumulação são superiores relativamente ao verificado para pH mais baixos (comparando com pH 5). O efeito da carga orgânica aplicada produz resultados coerentes com o esperado: para cargas mais altas, os níveis de acumulação são superiores. Finalmente fazendo variar o rácio C:N:P na fase de seleção (diminuição da quantidade de azoto adicionado) produz melhores resultados referentemente ao que tinha sido utilizado no início do trabalho. A limitação dos níveis de azoto leva a uma situação de stress por parte das culturas mistas, dado o azoto ser um componente necessário ao desenvolvimento das culturas. Assim, quando se faz uma redução de azoto as culturas têm tendência a acumular mais polímero. É de frisar que os resultados obtidos, para as diferentes condições, foram semelhantes para os dois tipos de alimentação utilizada, o que prova que estes resultados podem-se igualmente aplicar a outros tipos de substrato.

A tabela 16 ilustra surge de modo a analisar a eficiência de conversão do substrato em PHA nos diversos ensaios descontínuos.



Tabela 16 - Conversão de CQO em PHA

Alimentação	Batch	Condição			% PHA (mPHA/mSSV)	Conversão de substrato em PHA (mgPHA/gCQO)
		pH na alimentação	Carga orgânica (g <sub>CQO</sub> /L.d)	Rácio C:N:P		
Acidificado de FORSU	B1	5	1	186,5	10,81	186,5
	B2	10		350,2	19,76	350,2
	B5	Sem ajuste	2	222,5	25,76	222,5
	B6		3	179,0	31,04	179,0
	B9		2	271,7	38,97	271,7
Acidificado de soro de leite	B3	5	1	187,4	11,97	187,4
	B4	10		316,4	20,46	316,4
	B7	Sem ajuste	2	185,5	24,78	185,5
	B8		3	166,8	34,19	166,8
	B10		2	372,9	41,97	372,9

Analisando a conversão de CQO em polímero, chegamos à conclusão que os parâmetros que possuem maior eficiência neste aspeto é o pH e a limitação de azoto na fase de seleção. O *batch* B10 foi o que demonstrou ser o melhor acumulador em termos de massa de polímero por massa de biomassa, sendo igualmente o mais eficiente em termos de conversão de CQO. Com um valor muito aproximado da conversão do B10 está o B2 (pH 10, carga orgânica 1 g<sub>CQO</sub>/L.d e sem limitação de azoto na fase de seleção) tornando as condições de C:N:P igual a 100:5:1 e pH na alimentação preponderantes na fase de acumulação. Por outro lado, os níveis de conversão mais baixos registam-se para os ensaios em que a carga orgânica aplicada foi de 3 g<sub>CQO</sub>/L.d tendo os menores índices de aproveitamento dos AOV, nas duas alimentações. Sendo os AOV consumidos quase na sua totalidade, a cultura pode ter utilizado a elevada concentração de ácidos orgânicos voláteis para crescimento biológico, quando o que se pretendia era acumulação de PHA. Embora se obtenha maior acumulação com cargas mais elevadas, em termos de rendimento este parâmetro fica aquém dos resultados de conversão com aumento de pH na alimentação ou com limitação de azoto na fase de seleção das culturas produtoras de biopolímeros.

## 5. Conclusão

O estudo do ciclo do SBR permitiu um melhor entendimento do processo, principalmente do regime Fome/Fartura que é preponderante na seleção de culturas produtoras de PHA.

Numa primeira fase do projeto foi possível concluir que as lamas ativadas após a seleção das culturas possuem uma elevada apetência para a remoção de carência química de oxigénio, chegando mesmo a valores superiores a 95%, sendo que os melhores resultados foram obtidos para a alimentação de FORSU e rácio C:N:P de 100:7:1 (SBR 1).

Na primeira fase do trabalho foi feita a seleção das culturas mistas produtoras de PHA, sendo um dos parâmetros importantes para o objetivo geral do trabalho a produção de polímero no interior da biomassa. Dos quatro reatores SBR operados, aquele que obteve melhores resultados na acumulação de PHA foi o reator SBR 3 (alimentado com FORSU e limitação de azoto), com uma percentagem de polímero de 5,62 % (mPHA/mSSV).

Na segunda fase do projeto, fase de acumulação de PHA, foram testadas diversas condições tendo-se verificado que os níveis de acumulação do biopolímero foram superiores para valores de pH iniciais mais elevados, para cargas orgânicas aplicadas também mais elevadas e para níveis mais baixos de azoto adicionado (rácio C:N:P de 100:5:1). Obtiveram-se valores mais elevados de PHA acumulado na segunda fase do trabalho (ensaio descontínuos para acumulação de polímero), tendo-se observado um acréscimo em todos os ensaios realizados, com destaque para o reator descontínuo B10 (alimentado com soro de leite acidificado e limitação de azoto) em que se registaram valores de 41,97% (mPHA/mSSV).

Em termos de conversão de CQO em PHA destacam-se os ensaios com o reator B10 (soro de leite e limitação de azoto) e o reator B2 (FORSU e pH 10) com 372,9 mgPHA/gCQO e 350,2 mgPHA/gCQO, respetivamente. Operando o sistema na fase de acumulação de polímero com limitação de azoto e/ou um pH mais elevado na alimentação, torna os níveis de conversão da matéria orgânica em PHA superiores. Pelo contrário, ensaios descontínuos em que foram aplicadas cargas orgânicas mais elevadas (3 g<sub>CQO</sub>/L.d) são os que apresentam taxas de conversão menores.

## 6. Projetos futuros

No futuro deve-se testar outro tipo de substratos, mas também fazer variar o tempo de duração de cada ciclo ou a carga orgânica aplicada vendo o efeito produzido na seleção de culturas e na acumulação de PHA nos ensaios de *batch*.

Também devem-se testar outras condições, nomeadamente na fase de acumulação de PHA de modo a maximizar este processo, para que no futuro seja viável a sua produção. Como os resultados das conclusões são relativos ao estudo de cada condição em separado (pH, carga orgânica e rácio C:N:P) deve-se estudar a acumulação com os três parâmetros em paralelo, no mesmo ensaio, tanto em termos percentuais na biomassa, como em termos de conversão de CQO em PHA.

## 7. Bibliografia

- Ackermann, J.U., Babel, W., 1997. Growth associated synthesis of poly(hydroxybutyric acid) in *Methylobacterium rhodesianum* as an expression of an internal bottleneck. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 144–149.
- Akaraonye, Everest; Keshavarz, Tajalli; Roy, Ipsita. 2010- Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.* 85:6 p. 732–743.
- Albuquerque, M. G. E., Concas, S., Bengtsson, S., & Reis, M. A. M. (2010). Mixed culture polyhydroxyalkanoates production from sugar molasses: The use of a 2-stage CSTR system for culture selection. *Bioresource Technology*, 101(18), 7112–7122.
- Albuquerque, M. G. E., Martino, V., Pollet, E., Avérous, L., & Reis, M. A. M. (2011). Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from volatile fatty acid (VFA)-rich streams: Effect of substrate composition and feeding regime on PHA productivity, composition and properties. *Journal of Biotechnology*, 151(1), 66–76.
- Albuquerque, M. G. E., Carvalho, G., Kragelund, C., Silva, A. F., Crespo, M. T. B., Reis, M. A. M., & Nielsen, P. H. (2012). Link between microbial composition and carbon substrate-uptake preferences in a PHA-storing community, 7(1), 1–12.
- Ammary, B. Y. (2004). Nutrients requirements in biological industrial wastewater treatment. *African Journal of Biotechnology*, 3(4), 236–238.
- Appels, L., Baeyens, J., Degre, J., & Dewil, R. (2008). Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge, 34, 755–781.
- Arroja, Luís; Capela, Isabel; Nadais, Helena; Serafim, Luísa S.; Silva, Flávio. 2012- Acidogenic Valorisation of High Strength Waste Products from Food Industry. Industrial Waste, Prof. Kuan-Yeow Show (Ed.), InTech,
- Beccari, M., Bertin, L., Dionisi, D., Fava, F., Lampis, S., Majone, M., ... Villano, M. (2009). Exploiting olive oil mill effluents as a renewable resource for production of biodegradable polymers through a combined anaerobic-aerobic process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(6), 901–908.
- Bengtsson, S., Hallquist, J., Werker, A., & Welander, T. (2008). Acidogenic fermentation of industrial wastewaters : Effects of chemostat retention time and pH on volatile fatty acids production, 40, 492–499.
- Boe K. Online monitoring and control of the biogas process. Ph.D. Thesis, Institute of Environment & Resources, Technical University of Denmark, 2006.

- Borque, D., Pomerleau, Y., Groleau, D., 1995. High cell density production of polyhydroxybutyrate (PHB) from methanol by *Methylobacterium extorquens* production of high molecular mass PHB. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 367–376.
- Chen, G.-Q. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434–2446.
- Dionisi, D., Beccari, M., Gregorio, S. Di, Majone, M., Papini, M. P., & Vallini, G. (2005). Storage of biodegradable polymers by an enriched microbial community in a sequencing batch reactor operated at high organic load rate, 1318(December 2004), 1306–1318.
- Eaton, A. D., M. A. H. Franson, American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (2005). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. *Standard Methods*.
- Eggink, G., deWaard, P., Huijberts, G.N., 1995. Formation of novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. *Can. J. Microbiol.* 41, 14–21.
- Fradinho, J. C., Oehmen, a., & Reis, M. a M. (2014). Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. *Journal of Biotechnology*, 185, 19–27.
- Gameiro, T., Sousa, F., Silva, F. C., Nadais, H., & Capela, I. (2015). Olive Oil Mill Wastewater to Volatile Fatty Acids : Statistical Study of the Acidogenic Process.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1998. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Res.* 32, 5–12.
- Hansen, K.H., Angelidaki, I., Ahring, B.K., 1999. Improving thermophilic anaerobic digestion of swine manure. *Water Res.* 33, 1805–1810.
- Hashimoto, A.G., 1983. Thermophilic and mesophilic anaerobic fermentation of swine manure. *Agric. Wastes* 6, 175–191.
- Hreiz, R., Latifi, M. A., & Roche, N. (2015). Optimal design and operation of activated sludge processes: State-of-the-art.
- Jetten, M. S. M. (1998). The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms, 589–596.
- Johnson, Katja; Jiang, Yang; Kleerebezem, Robbert; Muyzer, Gerard; Van Loosdrecht, Mark C M. 2009- Enrichment of a mixed bacterial culture with a high polyhydroxyalkanoate storage capacity. *Biomacromolecules*. 10:4 670–6

- Kourmentza, C., Ntaikou, I., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2009). Production of PHAs from mixed and pure cultures of *Pseudomonas* sp. using short-chain fatty acids as carbon source under nitrogen limitation. *DES*, 248(1-3), 723–732.
- Kroeker, E.J., Schulte, D.D., Sparling, A.B., Lapp, H.M., 1979. Anaerobic treatment process stability. *J. Water Pollut. Control Fed.* 51, 718–727.
- Lee, Wee Shen; Chua, Adeline Seak May; Yeoh, Hak Koon; Ngoh, Gek Cheng. 2014 - A review of the production and applications of waste-derived volatile fatty acids. *Chemical Engineering Journal*. 235 p. 83–99
- Liebergessell, M., Sonomoto, K., Madkour, M., Mayer, F., Steinbuchel, A., 1994. Purification and characterization of the poly(hydroxyalkanoic acid) synthase from *Chromatium vinosum* and localization of the enzyme at the surface of poly(hydroxyalkanoic acid) granules. *Eur. J. Biochem.* 226, 71–80.
- Liu, T., Sung, S., 2002. Ammonia inhibition on thermophilic aceticlastic methanogens. *Water Sci. Technol.* 45, 113–120.
- Marang, L., Jiang, Y., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2013). Butyrate as preferred substrate for polyhydroxybutyrate production. *Bioresource Technology*, 142, 232–239.
- Mirtha, E.F., Lopez, N.I., Mendez, B.S., Furst, U.P., Steinbuchel, A., 1995. Isolation and partial characterization of *Bacillus megaterium* mutants deficient in poly(3-hydroxybutyrate) synthesis. *Can. J. Microbiol.* 41 (1), 77–79.
- Örmeci, B., & Vesilind, P. A. (2000). Development of an improved synthetic sludge: a possible surrogate for studying activated sludge dewatering characteristics. *Water Research*, 34(4), 1069–1078.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., & Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates : an overview, 87, 137–146.
- Reis, M. A. M.; Serafim, L. S.; Lemos, P. C.; Ramos, A. M.; Aguiar, F. R. & Van Loosdrecht, M. C. M. (2003). Production of polyhydroxyalkanoates by mixed microbial cultures. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol. 25, No. 6, pp. 377-385, 1615-7591
- Silva, F. C., Serafim, L. S., Nadais, H., Arroja, L., & Capela, I. (2013). Acidogenic Fermentation Towards Valorisation of Organic Waste Streams into Volatile Fatty Acids, 27(4), 467–476.
- Singh Saharan, Baljeet; Grewal, Anita; Kumar, Pardeep. 2014 - Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology*. 2014 p. 1–18

- Song, J.J., Yoon, S.C., 1996. Biosynthesis of novel aromaticc opolyesters from insoluble 11-phenoxyundecanoic acid by *Pseudomonas putida* BM01. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 536–544.
- Takeda, M., Matsuoka, H., Hamana, H., Hikuma, M., 1995. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate by *Sphaerotilus natans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 31–34.
- Tamisa, J., Lužkov, K., Jiang, Y., van Loosdrecht, M. C. M., & Kleerebezem, R. (2014). Enrichment of Plasticicumulans acidivorans at pilot-scale for PHA production on industrial wastewater. *Journal of Biotechnology*, 192 Pt A, 161–9.
- Tan, L.K.P., Kumar, K.S., Theanmalar, M., Gan, S.N., Gordon III, B., 1997. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 207– 211.
- Williams, S. F., & Martin, D. P. (1996). Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy, 1–38.
- Vergine, P., Sousa, F., Lopes, M., Silva, F., Gameiro, T., Nadais, H., & Capela, I. (2015). Synthetic soft drink wastewater suitability for the production of volatile fatty acids. *Process Biochemistry*, 50(8), 1308–1312.
- Yamane, T., Chen, X.-F., Ueda, S., 1996. Growth associated production of poly(3-hydroxyvalerate) from n-pentanol by a methylotrophic bac terium, *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 380–384.
- Zhang, H., Obias, V., Gonyer, K., Dennis, D., 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1198–1205.